

712

ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

BEGRÜNDET VON
J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

HERAUSGEGEBEN VON

C. B. VAN NIEL PACIFIC GROVE	R. NILSSON UPPSALA	E. G. PRINGSHEIM CAMBRIDGE
W. H. SCHOPFER BERN	H. TAMIYA TOKIO	

UND DEN SCHRIFTFLEITERN

A. RIPPEL-BALDES GÖTTINGEN	R. HARDER GÖTTINGEN
--------------------------------------	-------------------------------

19. BAND



BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1953

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH

Printed in Germany

Inhaltsverzeichnis.

v. 19

Seite

Heft 1

MEVIUS jr., W., Beiträge zur Kenntnis von <i>Hyphomicrobium vulgare</i> STUTZER et HARTLEB. Mit 27 Textabbildungen	1
VON SCHELHORN, M., Hemmende und abtötende Wirkung von Konservierungsmitteln	30
TAHA, EZZ-ELDIN M., Über Wechselbeziehungen zwischen Schimmelpilzen. 1. Der Einfluß verschiedener physiologischer Faktoren auf die Wechselbeziehungen zwischen <i>Alternaria tenuis</i> und <i>Fusarium semitectum</i> . Mit 3 Textabbildungen	45
BÜSING, K.-H., W. DÖLL und K. FREYTAG, Die Bakterienflora der medizinischen Blutegel. Mit 18 Textabbildungen	52
LANGE-DE LA CAMP, M., und W. STEINMANN, Speicherung von Schwermetallen in niederen Organismen. Mit 8 Textabbildungen.	87

Heft 2

CLAYTON, R. K., Studies in the phototaxis of <i>Rhodospirillum rubrum</i> . I. Action spectrum, growth in green light, and WEBER Law adherence. With 7 figures in the text	107
CLAYTON, R. K., Studies in the phototaxis of <i>Rhodospirillum rubrum</i> . II. The relation between phototaxis and photosynthesis. With 14 figures in the text	125
CLAYTON, R. K., Studies in the phototaxis of <i>Rhodospirillum rubrum</i> . III. Quantitative relations between stimulus and response. With 23 figures in the text.	
AACH, H. G., Über Abbau und Regeneration der Chloroplastenfarbstoffe bei <i>Chlorella</i>	166
VON ZASTROW, E. M., Über die Organisation der Cyanophyceenzelle. Mit 27 Textabbildungen	174
OETKER, H., Untersuchungen über die Ernährung einiger Myxobakterien. Mit 16 Textabbildungen	206

Heft 3

SÖRGEL, G., Über den Entwicklungsgang von <i>Mycosphaerella pinodes</i> (Berk. et Blox.) Stone. I. Die Bildung der Fortpflanzungsorgane in „normalen“ Kulturen. Mit 12 Textabbildungen	247
VAN UDEN, N., und L. ASSIS-LOPES, Zur Kenntnis von <i>Kloeckera Lodderi</i> sp. nov. Mit 1 Textabbildung.	262
ROYAN, S., Studies on the Cytology of Yeasts. X. Mitosis in the Riboflavin Excreting Mutant Top Yeast. With 5 figures	267
DOMSCH, K. H., Über den Einfluß photoperiodischer Behandlung auf die Befallsintensität beim Gerstenmehltau. Mit 34 Textabbildungen	287
NESEMANN, G., Über die antagonistische Beeinflussung des Wachstums und der Atmung bei einigen höheren Pilzen. Mit 11 Textabbildungen	319
PRINGSHEIM, E. G., Die Stellung der Grünen Bakterien im System der Organismen. Mit 1 Textabbildung	353

Heft 4

KÜHLWEIN, H., Weitere Untersuchungen an Myxobakterien. Mit 4 Textabbildungen	365
SÖRGEL, G., Über den Entwicklungsgang von <i>Mycosphaerella pinodes</i> (Berk. et Blox.) Stone. II. Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Ausbildung der Fortpflanzungsorgane. Mit 19 Textabbildungen . . .	372
HARDER, R., und A. OPFERMANN, Über antibiotische Stoffe bei den Grünalgen <i>Stichococcus bacillaris</i> und <i>Protosiphon botryoides</i>	398
LYR, H., Zur Kenntnis der Ernährungsphysiologie der Gattung <i>Pilobolus</i> . Mit 6 Textabbildungen	402
BURCIK, E., und B. PLANKENHORN, Darstellung von Bakteriengeißeln mittels Phasenkontakt. Mit 6 Textabbildungen	435
KESSLER, E., Über den Mechanismus der Nitratreduktion von Grünalgen. II. Vergleichend-physiologische Untersuchungen. Mit 2 Textabbildungen .	438

(Aus dem Staatsinstitut für Allgemeine Botanik und dem Botanischen Garten,
Hamburg.)

Beiträge zur Kenntnis von *Hyphomicrobium vulgare* STUTZER et HARTLEB*.

Von

WALTER MEVIUS jr.

Mit 27 Textabbildungen.

(Eingegangen am 29. Januar 1953.)

Hyphomicrobium vulgare wurde verschiedentlich in Rohkulturen von Nitrifikanten gefunden; eine Übersicht der älteren Literatur gibt BOLTJES, der sich 1934 im Rahmen einer Arbeit über nitrifizierende Bakterien näher mit diesem Organismus beschäftigte, 1936 seine Untersuchungen fortsetzte und vor allem nach der morphologischen Seite hin erweiterte. Ihm fielen beim Mikroskopieren von Belebtschlamm dünne Fäden auf, die aus den Flöckchen hervorragten, aber ungefärbt im Hellfeld nicht sichtbar waren. Sie erwiesen sich als die bekannten Anhängsel von *Hyphomicrobium*. Später fand er diesen Organismus auch in Anreicherungen von Nitrifikationsbakterien. Ebenso soll er sich aus langsam tropfenden, wenig gebrauchten Wasserhähnen gut isolieren lassen. Er nahm an, daß *Hyphomicrobium* ähnlich wie *Bac. oligocarbophilus* in der Lage sei, von den organischen Verunreinigungen der Luft zu leben. Auch HES (1937) wies in seiner Arbeit über Salpeterbakterien auf diesen Organismus hin. Endlich fand auch BÖMEKE (1939) *Hyphomicrobium* in Kulturen von Nitrifikanten. Die Abtrennung von *Nitrobacter* aus diesen Mischkulturen stieß jedoch auf die größten Schwierigkeiten. STEPHENSON (1950) erwähnt *Hyphomicrobium* als heterotrophe Verunreinigung in Kulturen autotropher Salpeterbakterien, die sich trotz mehrfachen Überimpfens auf anorganischen Medien hartnäckig hält.

Die systematische Stellung von *Hyphomicrobium* ist noch äußerst unklar. STUTZER u. HARTLEB (1898) gaben an, daß es sich von den Bakterien in morphologischer Hinsicht durch die Ausbildung von Hyphen und die Art der Vermehrung unterscheide. Schon der Name selbst sollte eine Verwandtschaft mit den Fadenpilzen andeuten, von denen es ihrer Auffassung nach jedoch in physiologischer Hinsicht deutlich abweicht, indem es u. a. nicht auf Zucker wächst und empfindlich gegen freie Säure ist. ENLWS (1920) ordnete es als Monotyp innerhalb der Bakterien ein. HENRICI und JOHNSON (1935) stellten *Hyphomicrobium* in eine neue Ordnung gestellter Bakterien. BOLTJES (1934) betonte mit Recht, daß eine einwandfreie systematische Eingruppierung noch nicht möglich sei. Er hielt es für wahrscheinlich, daß dieser Organismus einen Übergang zwischen Bakterien und Phycomyceten darstelle. STANIER u. VAN NIEL (1941) stellten *Hyphomicrobium* zu den *Pasteuriaceae* und somit in den Anhang der *Schizomycetes*. In „Bergey's Manual of Determinative Bacteriology“ (1948) findet sich *Hyphomicrobium* in Anlehnung an STANIER u. VAN NIEL als Anhang der Unterordnung der *Caulobakterien*. Diese Unterbringung ist aber nur ein Notbehelf und sagt nichts über die wirklichen verwandtschaftlichen Beziehungen aus. Auch RIPPPEL-BALDES (1952) glaubte, daß die systematische Einordnung innerhalb der eigentlichen Bakterien noch verfrüht und unsicher sei.

* Auszug aus der gleichnamigen Dissertation der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hamburg 1952.

Ausgangspunkt meiner Untersuchungen war die auffallende Tatsache, daß *Hyphomicrobium* einer der beharrlichsten Begleiter nitrifizierender Bakterien ist. Auch der von mir untersuchte Stamm fand sich als Verunreinigung in einer Nitritbildnerkultur. Das häufige gemeinsame Vorkommen zwingt zu der Frage, wie wir uns das Zusammenleben vorzustellen haben, zumal STEPHENSON (1950) betont, daß eine Trennung auch bei Verwendung reiner Chemikalien und mehrfach destillierten Wassers auf Grund der selektiven Eigenschaft der WINOGRADSKYSchen Nitrifikations-Nährlösung nicht möglich sei. Lebt *Hyphomicrobium* vielleicht von organischen Stoffen, die die Salpeterbakterien ausscheiden? Oder müssen wir uns das Zusammenleben so vorstellen, daß *Hyphomicrobium* ähnliche Ansprüche an das Milieu stellt wie die Nitrifikationserreger? Es wäre z. B. denkbar, daß es autotroph lebt und in der Lage ist, die freie Kohlensäure ebenso zu assimilieren wie die Nitrifikationsorganismen, wobei die dafür notwendige Energie vielleicht aus der Oxydation der eben erwähnten organischen Stoffe stammt. Es war der Zweck meiner Untersuchungen, Licht in diese Fragen zu bringen.

Herkunft, Isolierung und mikroskopisches Aussehen.

Zur Isolierung von *Hyphomicrobium* diente eine *Nitrosomonas*-Rohkultur, die aus einer Schlickprobe des Elbufers dicht westlich der Anlegebrücke „Alte Liebe“ in Cuxhaven gewonnen worden war. Die Reinzucht gelang nach der von ENGEL u. SKALLAU (1937) für Salpeterbakterien angegebenen Methode und anschließendem mehrfachen Umzüchten auf Hefewasser und einer auch in den folgenden Versuchen verwendeten synthetischen Nährlösung — ähnlich den Angaben von BOLTJES (1935) —:

Na-Formiat 1 g, KNO_3 1 g, KH_2PO_4 oder Na_2HPO_4 1 g, NaCl 0,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mg, Aq. dest. 1000 cm³ (ohne HCOONa -Stammlösung).

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf etwa 7,2—7,5 eingestellt. Als Kulturgefäße dienten 100 cm³-ERLENMEYER-Kolben aus Jenaer Glas, in denen die Flüssigkeit — zur genügenden Sauerstoffversorgung — nur 1 cm hoch stand. Anzuchttemperatur 30—37° C. Über den Hals der mit Watte verschlossenen Kolben wurde eine Staniolkappe gestülpt, um die Gefahr des Eindringens von Fremdorganismen sowie die der Eindunstung der Nährlösung bei der mehrere Wochen dauernden Kultur auf

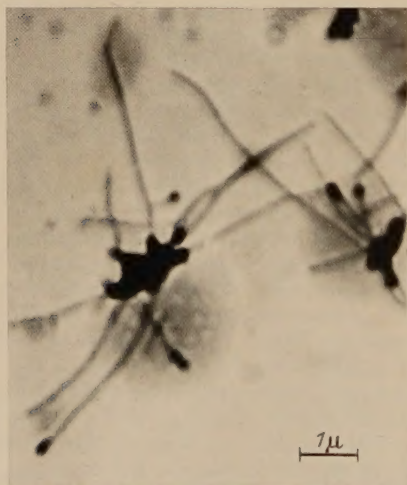


Abb. 1. *Hyphomicrobium vulgare*. Hyphen mittels Geißelfärbung nach GRAY sichtbar gemacht. Am Ende eines kurzen Seitenzweiges findet sich ein Knöpfchen.

ein Minimum herabzusetzen. Eine so lange Kulturdauer war erforderlich, da *Hyphomicrobium*, ähnlich wie die nitrifizierenden Bakterien, nur sehr langsam wächst. Als Reinheitskriterium diente neben dem lichtmikroskopischen Bild das Ausbleiben

einer Trübung von Fleischextraktbrühe und Hefewasser. Zwar erfolgte auf diesen Substraten schwache Vermehrung, die aber nicht mit der bekannter, heterotropher Organismen zu vergleichen war. Der sich nach mehreren Tagen auf der Oberfläche bildende feine, fast weiße Film bestand lediglich aus den durch Hyphen miteinander verfilzten Zellen von *Hyphomicrobium*. Notwendig erschien es aber, daß verhältnismäßig stark geimpft wurde.

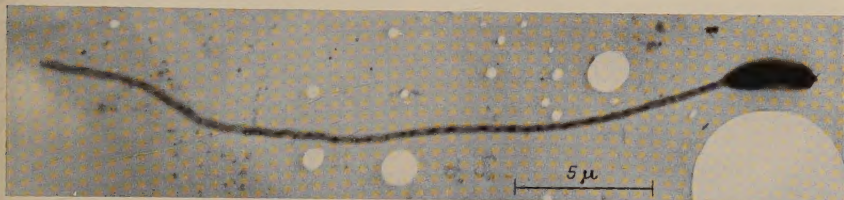


Abb. 2. *Hyphomicrobium vulgare*. Sowohl in den Zellen wie in der Hyphe zeigt sich eine Innenstruktur. Elektronenoptisch. (ENGEL u. MEVIUS jr. 1951.)

Was die Verbreitung von *Hyphomicrobium* betrifft, so wurde sein Vorkommen in folgenden Boden- und Wasserproben festgestellt: Botanischer Garten Hamburg, Komposthaufen; Wedel/Holstein, Sandboden; Elbe bei Cuxhaven; Burgsteinfurt/Westf., Waldboden; Lissabon, lehmiger Sand; Geisecke/Ruhr, sandiger Lehm; Ruhrstau bei Geisecke. Nicht gefunden wurde es lediglich in einer Ackerbodenprobe aus Schweden. Der Organismus ist also, wie auch schon von anderen Autoren betont wurde, ein sehr verbreiteter Bewohner des Bodens und Wassers.

Da über das mikroskopische Bild des von mir isolierten Stammes von *Hyphomicrobium* bereits eingehend berichtet worden ist (ENGEL u. MEVIUS jr. 1951), seien hier nur kurz einige ergänzende Hinweise gegeben. Bei Anwendung von Methoden der Geißelfärbung färbten sich die Hyphen besonders gut, und ich konnte bestätigen, daß neben den normalen Hyphen auch solche mit Verzweigungen vorkommen. Gelegentlich war an den Enden der Verzweigungen ein Knöpfchen sichtbar (Abb. 1). Über den Aufbau der Hyphen ließen sich aber nach dieser Methode keine Aussagen machen. Im Elektronenmikroskop zeigten die Hyphen „auf ihrer ganzen Länge eine Gliederung in dunklere und hellere Partien in mehr oder weniger regelmäßiger Reihenfolge“ (ENGEL u. MEVIUS jr. 1951) (Abb. 2 u. 3).



Abb. 3. *Hyphomicrobium vulgare*. Innenstruktur der Hyphen. Elektronenoptisch.

In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß JAKOB (1947) überraschend ähnliche Strukturen bei elektronenoptischen Aufnahmen von *Lues-Spirochäten* gefunden hat. SCHLOSSBERGER, JAKOB u. PIEKARSKI (1950) nahmen an, daß bei den Spirochäten auf der Länge der „Spiralen“ mehrere Nucleoide verteilt sind. Geradezu verblüffend ähnlich sind auch die elektronenoptischen Aufnahmen JAKOBs (1947 a) von *Leptospira canicola*. Bei einem seiner Stämme trat nach jahrelanger Kultur plötzlich eine „S-Form“ auf. Die *Leptospire* war jetzt nicht mehr geschlängelt, sondern glatt und bildete an ihrem Ende eine „Knospe“ aus. Diese Formen sehen im Elektronenmikroskop *Hyphomicrobium* in der äußeren Form sowie in ihrem inneren Aufbau täuschend ähnlich und entsprechen diesem auch in ihrer Größe, so daß der Eindruck entsteht, es könnte sich hier um eine Verunreinigung von *Leptospira canicola* mit *Hyphomicrobium* gehandelt haben.

Fortpflanzung.

BOLTJES (1936) hat das Wachstum der sich am freien Ende der Fäden ausbildenden Knöpfchen im Dunkelfeld bei Kulturen auf sehr dünnen Agarplättchen verfolgt. Es gelang ihm merkwürdigerweise nicht, *Hyphomicrobium* unter dem Mikroskop in Nährlösung, z. B. im „hängenden Tropfen“ zur Entwicklung zu bringen. Wie später noch ausführlich berichtet werden wird, stellt Methanol ein noch geeigneteres organisches Substrat als Na-Formiat dar. Ich verfolgte daher in diesem Medium die Entwicklung von *Hyphomicrobium* und benutzte zur Beobachtung das Phasenkontrastverfahren (Firma E. Leitz).

Das Präparat befand sich auf einem Heiztisch bei 37° C. Neben der visuellen Beobachtung wurden als Beleg Serien photographischer Aufnahmen mit Hilfe des Mikroansatzes (Stutzen $\frac{1}{2}$ fach) und der Leica hergestellt. Als Film bewährte sich am besten der „Micro-File“ der Eastman-Kodak Company, Rochester, N. Y., USA, in Verbindung mit einem strengen orange Lichtfilter. Beim Phasenkontrastverfahren war die Verwendung des „hängenden Tropfens“ wegen seiner Linsenwirkung nicht günstig, da dann eine Justierung nur sehr schwer zu erreichen ist. Zählkammern eigneten sich auf Grund der relativ großen Schichtdicke des Präparates nicht. Der Phaseneffekt ist desto besser, je dünner das Objekt ist. Nach vergeblichen Versuchen, flachere Kammern herzustellen, wurden schließlich normale Objektträger und große Deckgläser verwendet, zwischen die, nach dem Sterilisieren, mit der Platinöse einige Tropfen einer 1—2 Tage alten Kultur gebracht wurden. Zur Sauerstoffversorgung der Organismen befanden sich einige Luftblasen unter dem Deckglas. Gegen Austrocknen wurde das Präparat mit Paraffin umrandet.

Es zeigte sich das in den Abb. 4—7 wiedergegebene Bild¹: Am freien Ende der polar ansitzenden, meist unverzweigten Hyphe bildet sich langsam ein kleines Knöpfchen, das in etwa 10—15 Std zu einer länglichen, leicht gekrümmten Tochterzelle heranwächst, die meist etwas länger und schlanker ist als die Mutterzelle. In ihrem Inneren befindet sich, ebenso wie auch in der Mutterzelle, ein länglich-rundlicher, stärker lichtbrechender Körper (siehe auch ENGEL u. MEVIUS jr. 1951). Nach einiger Zeit beginnt die Tochterzelle plötzlich lebhaft zu zappeln, um dann fast ebenso schlagartig wieder zur Ruhe zu kommen. Dieses Spiel

¹ Die übrigen Originalaufnahmen können in der Dissertation eingesehen werden.

wiederholt sich noch mehrfach, bis sich die Zelle schließlich losreißt und sehr schnell, anscheinend mehr oder weniger unter Drehungen um die eigene Achse, im Zickzackkurs davonschwimmt. Nach einiger Zeit bildet sich an der gleichen Hyphe erneut ein Knöpfchen, welches wieder im Laufe von 10—15 Std zu einem Schwärmer heranwächst, der sich losreißt und fortschwimmt. Am Ende einer Hyphe werden also mehrfach

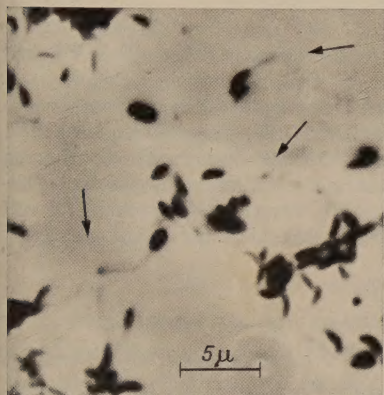


Abb. 4.

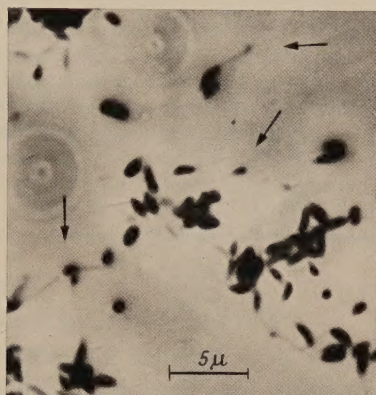


Abb. 5.

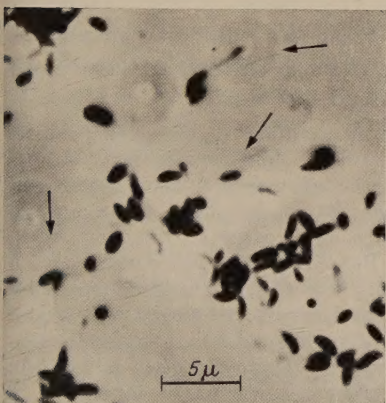


Abb. 6.

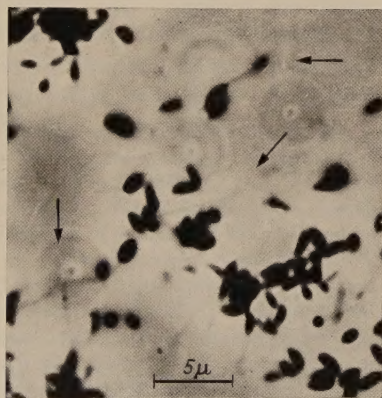


Abb. 7.

Abb. 4—7. Die Serie von Aufnahmen zeigt die Entwicklung von *Hyphomicrobium* in einer etwas älteren Kultur. Besonders schön ist das Wachstum der Tochterzellen bis zum fertigen Schwärmer bei den drei aufeinander zulaufenden Hyphen sowie den am oberen Bildrande liegenden einzelnen Zellen zu verfolgen (siehe Pfeile). An dem freien Hyphenende (Abb. 4) bildet sich zunächst ein kleines Knöpfchen (Abb. 5), welches zu einem leicht gebogenen Schwärmer heranwächst (Abb. 6), sich dann loszappelt und fortschwimmt (Abb. 7).

hintereinander — BOLTJES (1936) gibt für Agarplatten bis zu achtmal an — Schwärmer ausgebildet. Eine andere Vermehrungsart, etwa durch einfache Querteilung der Zellen, konnte ich nicht beobachten.

Damit war es, im Gegensatz zu BOLTJES (1936), gelungen, die Entwicklung der Tochterzellen an den Hyphenenden von *Hyphomicrobium* auch in flüssiger Kultur am lebenden Objekt zu beobachten. Die Geißeln der Schwärmer konnten auch mit spezifischen Geißelfärbungsmethoden nicht einwandfrei nachgewiesen werden. Lediglich im Dunkel- feld konnte zeitweise an dem der Hyphe entgegengesetzten Pol der Tochterzelle ein heller Hof beobachtet werden, der von einer schnell schlagenden Geißel zu stammen schien.

Lebendaufnahmen der Schwärmer sowie ihrer Bewegungen ließen sich auf Grund der sehr schnellen Beweglichkeit nicht herstellen. Die erforderlichen Belichtungszeiten bedingten sehr starke Lichtquellen, wie sie selbst bei Gleichstrom-Bogenlampen nicht gegeben waren. Auch die von METZNER (1920) angewandte Methodik, mit Hilfe der stroboskopischen Beleuchtung die schnellen Bewegungen sichtbar zu machen, war in Verbindung mit dem Phasenkontrastverfahren nicht gangbar. Vielleicht werden Aufnahmen dieser Art möglich sein, wenn ein Elektronenblitz mit seiner sehr starken Lichtintensität auch für die Mikroskopie zur Verfügung steht.

Physiologie.

Methodisches zur BARCROFT-WARBURG-Apparatur.

Um einen Einblick in den Stoffwechsel von *Hyphomicrobium* zu bekommen, über den bisher nur recht vage Vorstellungen bestehen, die sich zudem bei den verschiedenen Autoren auch noch widersprechen, prüfte ich zunächst den Gaswechsel des Organismus in der BARCROFT-WARBURG-Apparatur (Firma B. Braun, Melsungen). Bei dem langsamen Wachstum von *Hyphomicrobium* und dem zu erwartenden Gaswechsel mußten die Versuche auf 3—10 Tage ausgedehnt werden.

Ich arbeitete mit Differentialmanometern, die nach den Angaben von BÖMEKE (1939) am unteren, umgebogenen Teil geöffnet waren und hier einen Gummischlauchverschluß mit Quetschschraube besaßen, wie er an einfachen Manometern allgemein vorhanden ist (Abb. 8). Geräte ähnlicher Bauart benutzten, wenn auch zu anderem Zweck, WARBURG u. KUBOWITZ (1928) sowie DICKENS u. GREVILLE (1933). Auf die Vorteile dieser Apparatur hat bereits BÖMEKE (1939) hingewiesen, und ich kann seine Angaben nur bestätigen. Die mir zur Verfügung stehenden Manometer besaßen einen Capillarquerschnitt von etwa 1 mm². Eine Verringerung auf 0,2 mm² würde bei gleichem Gasumsatz eine erhebliche Vergrößerung der Ausschläge bedeu- tet haben. Gerade dies wäre für das Arbeiten mit *Hyphomicrobium* mit seinem relativ trägen Gaswechsel äußerst erwünscht gewesen. Leider waren empfindlichere Manometer nicht zu erhalten. Als Reaktionströge wurden Gefäße aus Jenaer Durobax-Glas der Firma B. Braun, Melsungen, Form Ia, verwendet.

Die gebildeten bzw. verschwundenen Gasmengen wurden aus den Druckdifferenzen von jeweils zwei Differentialmanometern berechnet. Dabei arbeitete ich teils mit verschiedenen Mengen Flüssigkeit, jedoch gleichen Zellmengen, also ungleichen Zellkonzentrationen, teils mit verschiedenen Mengen Flüssigkeit und verschiedenen Zellmengen, jedoch gleichen Zellkonzentrationen (GAFFRON 1929). Nach Beendi- gung eines jeden Versuches testete ich das Substrat durch Abimpfen auf Bouillon und Hefewasser auf Reinheit und prüfte es außerdem mikroskopisch. Ergebnisse aus Ansätzen, bei denen sich eine Verunreinigung zeigte, blieben unberücksichtigt. Den pH-Wert bestimmte ich mittels Merck-Spezial-Indicatorpapier. Er lag um

7,2. Die Temperatur des Wasserbades betrug bei den ersten Versuchen 37° C, später 30° und 25°, da sich bei höherer Temperatur infolge starken Absinkens der Raumtemperatur nachts in den Capillaren, soweit sie aus dem Wasserbad ragten, Kondenswasser ansammelte, was zu Verstopfungen und damit zu Ablesefehlern führte. Die Sterilisation der Reaktionsgefäße erfolgte in einem Becherglas mit Deckel 30 min bei 1 atü strömendem Dampf im Autoklaven, die der Glasgeräte (Pipetten, Zentrifugiergläser usw.) im Trockensterilisator 120 min bei 180° C.

Die größte Gefahr durch Fremdinfektion drohte den Kulturen während des Zentrifugierens. Um sie herabzusetzen, wurden die Zentrifugiergläser mit Deckeln (Stanniolkappen) versehen. Die Manometer selbst wurden mehrfach mit Alkohol abgewaschen, abgeflammt und außerdem von Zeit zu Zeit im Autoklaven sterilisiert, da sich gezeigt hatte, daß sich in den Schliffen und den benachbarten Capillarstücken Pilze entwickelten (vermutlich auf dem Hahnfett und der Brodieflüssigkeit). Trotz aller Vorsichtsmaßnahmen fielen noch etwa 50% aller Versuche durch Verunreinigungen aus. Als Dichtungsmittel für die Schliffe fand anfangs *Adeps lanae*, später Silicone Verwendung.

Atmungsquotient.

In der Literatur finden sich bisher keinerlei Angaben über den Gaswechsel von *Hyphomicrobium*. Es wächst auf Ameisensäure, Essigsäure, Methanol, Glycerin und anderen relativ einfach gebauten organischen Verbindungen. Es entwickelt sich aber auch in der rein mineralischen Nährlösung nitrifizierender Bakterien und lebt an so energiearmen und ausgefallenen Standorten wie langsam tropfenden Wasserhähnen (BOLTJES 1936). Es ist aber nicht bekannt, wie die organischen Stoffe abgebaut werden, ob dazu Sauerstoff benötigt wird, bzw. wieviel Kohlensäure gebildet wird und ob daneben noch andere Gase entstehen.

Ich untersuchte zunächst, ob für den Abbau solcher Stoffe, auf denen *Hyphomicrobium* wächst (Ameisensäure, Essigsäure u. a.), Sauerstoff benötigt wird und ob das Endprodukt des Stoffwechsels CO_2 ist. Der Atmungsquotient mußte dann bereits gewisse Einblicke in die Art des Abbaues gewähren.

Hyphomicrobium wurde in 100 cm³ ERLÉNMEYER-Kolben auf 20 cm³ der eingangs erwähnten mineralischen Stammlösung gezüchtet, der 0,1% der zu prüfenden organischen Stoffe zugesetzt war. Nach 2—4 Wochen wurde der Inhalt der Kölbechen abzentrifugiert, der Niederschlag in neuer, steriler Nährlösung (20 cm³) aufgenommen und 3 bzw. 5 cm³ dieser Suspension in die Atmungströge der WARBURG-Apparatur gebracht. Diese Versuche liefen ohne Kalilauge in den dafür bestimmten Einsätzen der Reaktionsgefäße, da sich herausgestellt hatte — wie weiter unten noch näher berichtet wird —, daß bei Gegenwart von KOH kein Gaswechsel stattfindet.

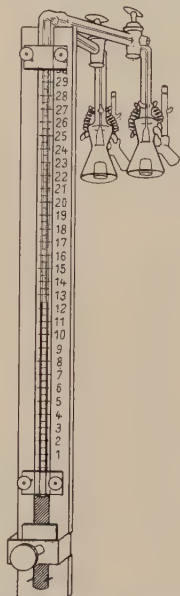


Abb. 8. Differentialmanometer mit Gummischlauchverschluß und Quetschschraube.

Bei Verwendung von Ameisensäure, Essigsäure, Glycerin, Methanol und Äthanol war stets eine Druckabnahme zu beobachten. Unter der Voraussetzung, daß *Hyphomicrobium* nicht in der Lage ist, den freien Luftstickstoff zu binden (wofür keinerlei Anhaltspunkte in der Literatur zu finden sind), konnte unter den gegebenen Umständen die Druckabnahme nur auf einer Sauerstoffaufnahme beruhen (Abb. 9—11). Die Berechnung des Sauerstoffverbrauches ergab bei Na-Formiat, Na-Acetat sowie bei Glycerin typische Wachstumskurven. Sie zeigen, daß auf den geprüften Substanzen neben der O_2 -Aufnahme auch eine Vermehrung der Zellen erfolgte.

Der Nachweis der gleichzeitigen CO_2 -Abgabe in der üblichen Weise durch Zusatz von 0,5 cm³ Kalilauge in den hierfür bestimmten Einsatz des Reaktionsgefäßes schlug überraschenderweise fehl. Der erwartete

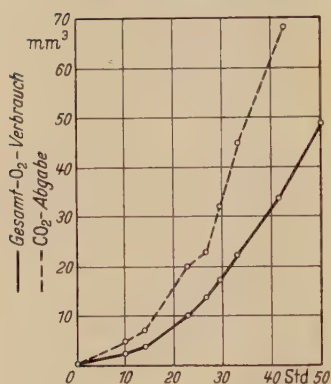


Abb. 9.

Abb. 9. Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe von *Hyphomicrobium*. Energiequelle: Na-Formiat; 3 cm³ Zellsuspension bzw. 3 cm³ Zellsuspension + 2 cm³ H₂O; Suspension in Stammlösung + 0,1% Na-Formiat; Temperatur 30° C.

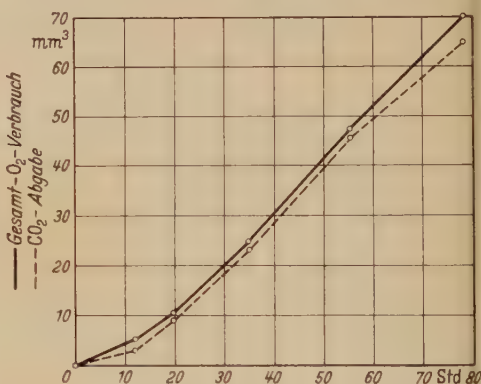


Abb. 10.

Abb. 10. Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe von *Hyphomicrobium*. Energiequelle: Na-Acetat, 3 bzw. 5 cm³ Zellsuspension in Stammlösung + 0,1% Na-Acetat; Temperatur 30° C.

höhere Druckabfall gegenüber den Versuchen ohne KOH blieb nicht nur aus, sondern es fand überhaupt keine oder nur eine sehr geringe Druckverminderung statt, obwohl die Versuchsdauer bis zu 12 Tagen ausgedehnt wurde (Abb. 12). Mehrfache Wiederholung dieser Versuche bewies, daß kein Irrtum vorlag. Daraus mußte also geschlossen werden, daß der Entzug der Kohlensäure durch den KOH-Zusatz das Wachstum von *Hyphomicrobium* sistierte. Auch zeigte die mikroskopische Kontrolle, daß keine Zellvermehrung stattgefunden hatte. Die Zellen waren schlecht färbbar und anscheinend mehr oder weniger geschädigt. Da der pH-Wert in den einzelnen Versuchen zwischen 7,3 und 8,0 lag, sich also von dem in den Reaktionströgen ohne KOH nicht wesentlich unterschied, konnte er nicht der Grund des Wachstumstillstandes sein. Ich werde auf diese bemerkenswerte Tatsache in einem späteren Kapitel noch zurückkommen.

In diesem Zusammenhang sei ein Brief von STUTZER an BURRI erwähnt (STUTZER u. HARTLEB 1898), in dem er mitteilt, daß nach seinen Beobachtungen das Wachstum von *Hyphomicrobium* bei CO_2 -Entzug unterdrückt wurde.

Obwohl es mir somit nicht gelungen war, die Abgabe von CO_2 durch *Hyphomicrobium* unmittelbar zu zeigen, gingen meine weiteren Überlegungen dennoch von der Voraussetzung aus, daß eine solche tatsächlich vorhanden sei. Nimmt man das an, so lassen sich die oben erwähnten Versuche über Sauerstoffaufnahme auch zur Berechnung der CO_2 -Abgabe verwerten (siehe GAFFRON 1929). Man kommt dann zu den in den Abb. 9, 10 und 11 eingezeichneten Kurven.

Aus den Werten für O_2 -Aufnahme und CO_2 -Abgabe lassen sich weiter die Atmungsquotienten berechnen. Wie aus Tab. 1 hervorgeht, fand ich

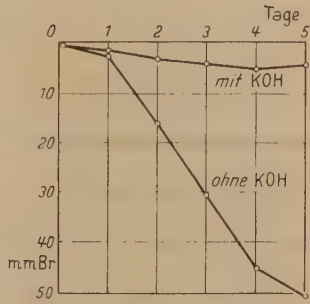
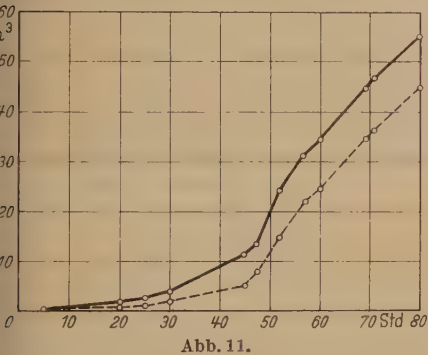
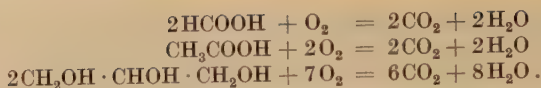


Abb. 11. Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe von *Hyphomicrobium*. Energiequelle: Glycerin; 3 cm³ Zellsuspension bzw. 3 cm³ Zellsuspension + 2 cm³ H₂O; Suspension in Stammlösung + 0,1% Glycerin; Temperatur 30° C.
Abb. 12. Druckabnahme beim Wachstum von *Hyphomicrobium* mit bzw. ohne KOH-Zusatz. Energiequelle: Na-Formiat Kulturflüssigkeit 5 cm³; p_H 7,5; Temperatur 30° C.

Tabelle 1. Atmungsquotienten von *Hyphomicrobium*.

Energiequelle	Versuchsbeginn	Atmungsquotient	
		gefundener	erwarteter
Na-Formiat . .	7. 2. 51	2,08	2,00
	21. 3. 51	1,96	
	5. 7. 51	1,89	
Na-Acetat . . .	20. 1. 51	1,02	1,00
	6. 3. 51	1,08	
	9. 3. 51	0,96	
Glycerin	13. 3. 51	0,845	0,856
	23. 3. 51	0,864	
	25. 3. 51	1,07	

für Ameisensäure den Wert von etwa 2, für Essigsäure 1 und Glycerin 0,9. Das sind Werte, die unter der Annahme zu erwarten sind, daß der Abbau der organischen Energiequellen nach folgenden Gleichungen bis zu CO_2 und H_2O durchgeführt wird:



Wir dürfen aus dieser guten Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment den Schluß ziehen, daß *Hyphomicrobium* die ihm gebotenen Energiequellen tatsächlich in der genannten Weise abbaut. Diese Übereinstimmung kann kein Zufall sein, sondern muß als Beweis für das Vorhandensein einer CO_2 -Abgabe angesehen werden.

Allerdings war die Übereinstimmung nicht immer so gut wie in Tab. 1, sondern in manchen, wenn auch in der Minderzahl bleibenden Versuchsansätzen traten erhebliche Abweichungen auf, für die ich einstweilen keine Erklärung habe. So wurde auf Oxalsäure in einigen Ansätzen der theoretische Wert $\text{CO}_2/\text{O}_2 = 4$ gefunden, in anderen dagegen Werte zwischen 2 und 3. Auch Ameisensäure lieferte mitunter völlig abweichende Quotienten. Aber es darf, wie schon betont wurde, nicht übersehen werden, daß der Druck in den Reaktionsgefäßen infolge des trägen Stoffwechsels von *Hyphomicrobium* nur sehr langsam abnahm und die Apparatur für diese Versuche verhältnismäßig wenig empfindlich war. Fehlerquellen der verschiedensten Art machten sich daher äußerst störend bemerkbar.

Weiterhin konnte beobachtet werden, daß der Atmungsquotient während des Versuches nicht konstant bleibt, sondern sich, besonders gegen Ende des Versuches, langsam ändert. Offenbar geht bei Erschöpfung der Energiequelle die Substratatmung langsam in Restatmung über, der zelleigene Stoffe mit anderen Atmungsquotienten zugrunde liegen. Es ist daher für die Berechnung des Atmungsquotienten nicht gleichgültig, zu welchem Zeitpunkt man sie vornimmt. Die oben angegebenen Werte sind für den Zeitraum vom 2. bis zum 3. Versuchstag berechnet. Der erste Versuchstag zeigte meist so kleine Ausschläge an den Manometern, daß der Ablesefehler zu groß wurde und daher eine Berechnung des R.Q.-Wertes illusorisch war.

Weitere Versuche hatten zum Ziel, den Atmungsquotienten bei Verbindungen mit höherem Molekulargewicht zu ermitteln. Die hierfür benutzten Kohlenhydrate (Glucose, Mannose, Raffinose usw.) wurden getrennt von der Stammlösung durch fraktionierte Sterilisation im Dampftopf keimfrei gemacht, um so ein Karamelisieren und eine Verschiebung des pH-Wertes zu verhindern. Die beobachteten Druckänderungen waren aber, selbst nach mehreren Tagen, so gering, daß sie von der Veratmung von Verunreinigungen herrühren oder auf Restatmung beruhen konnten. Damit findet die Angabe von BOLTJES (1936) eine Bestätigung, wonach *Hyphomicrobium* Zucker nicht verarbeiten kann. Da wegen der geringen Manometerausschläge die der Apparatur innewohnenden Fehler sehr ins Gewicht fielen, sei auf eine bildliche Wiedergabe dieser Versuche verzichtet.

Bei den bisherigen Versuchen befand sich die organische Energiequelle von Anfang an im Bakterienansatz. Das ist insofern nicht ganz einwandfrei, als der beobachtete Gasumsatz nicht allein auf dem Abbau der von

außen gebotenen Energiequellen beruht, sondern diesem auch zelleigene organische Stoffe zugrunde liegen können. Jedenfalls blieb dabei unbekannt, wie sich die beobachtete Atmung quantitativ auf beide verteilte. Um hierüber mehr aussagen zu können, gab ich in den folgenden Versuchen die Energiequelle in den seitlichen, dafür bestimmten Ansatz der Reaktionsgefäße und kippte sie erst während des Versuches zu, nachdem die Zellen zunächst in der Hauptsache ihre Restatmung durchgeführt hatten.

Durch diese Art der Versuchsanstellung wurde zudem der Einfluß der organischen Energiequelle auf die Atmung noch augenscheinlicher. Nach dem Zentrifugieren einer 14 Tage alten Kultur wurden die Zellen in neuer, diesmal rein mineralischer, steriler Nährlösung aufgeschwemmt. Die organische Substanz befand sich als meist 1%ige Lösung in dem Seitenansatz der Reaktionsgefäße. Nach einer Versuchsdauer von 2—3 Tagen wurde sie der Zellsuspension zugekippt.

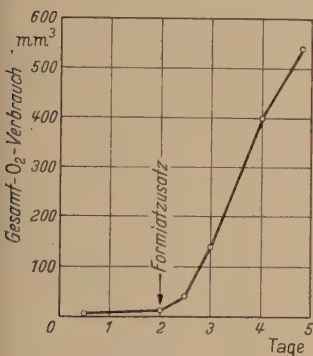


Abb. 13.

Abb. 13. Sauerstoffaufnahme von *Hyphomicrobium*; Energiequelle: Na-Formiat; 5 cm³ Zellsuspension (Stammlösung); 1 cm³ Zusatz (1% ige Na-Formiatlösung); Temperatur 30° C.

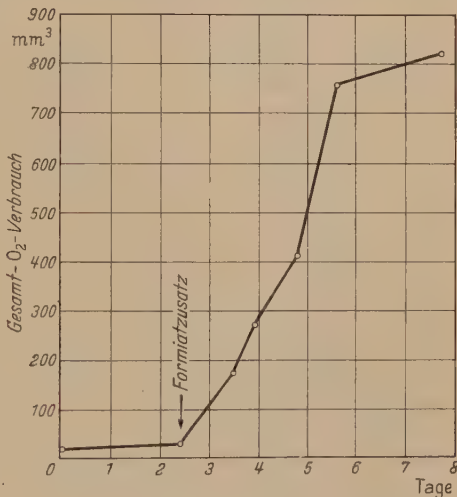


Abb. 14.

Abb. 14. Sauerstoffaufnahme von *Hyphomicrobium*; Energiequelle: Na-Formiat; 5 cm³ Zellsuspension (Stammlösung); 1 cm³ Zusatz (0,25% Na-Formiat); Temperatur 30° C.

Das Ergebnis einiger solcher Versuche ist in den Abb. 13—15 wiedergegeben. In fast allen Ansätzen erfuhr die Atmung unmittelbar nach Zukippen der organischen Substanz eine sehr beachtliche Steigerung. Diese Substratatmung war gegenüber der Restatmung so groß, daß letztere für die Berechnung des Atmungsquotienten nicht wesentlich ins Gewicht fiel. Das erkennt man besonders deutlich bei den Ansätzen mit gleichzeitiger Kontrolle. (Organische Substanz im Ansatz wurde nicht zugekippt.)

Bei den von mir benutzten Alkoholen erwies sich die obige Versuchsanstellung jedoch als nicht anwendbar. Die Manometer zeigten bereits vor Zukippen der organischen Substanz beträchtliche Druckabnahmen

(Abb. 16). Es wurde also Sauerstoff verbraucht, obwohl die Nährlösung anfangs keine Energiequelle enthielt. Die Substrat-Atmung von *Hyphomicrobium* muß also durch Überdestillieren des Alkohols aus dem seitlichen Ansatz in die Nährlösung unterhalten worden sein. Um aber festzustellen, wie *Hyphomicrobium* im Augenblick des Alkoholzusatzes reagiert, wurde der Alkohol nach getrenntem Sterilisieren von außen mittels keimfreier Pipette zur Nährlösung hinzugegeben. Wie man sieht (Abb. 17 und 18), veratmet *Hyphomicrobium* die beiden Alkohole ausgezeichnet, jedenfalls wesentlich schneller als die entsprechenden organischen Säuren. Der Atmungsquotient wurde nicht berechnet, da der Dampfdruck des

Alkohols als dritte veränderliche Größe in die Formel eingeht.

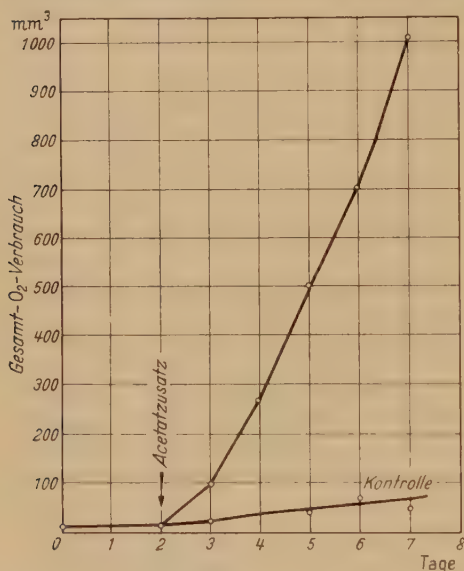


Abb. 15.

Abb. 15. Sauerstoffaufnahme von *Hyphomicrobium*; Energiequelle: Na-Acetat; 5 cm³ Zellsuspension (StammLösung); 1 cm³ Zusatz (1% iges Na-Acetat); Temperatur 30° C.

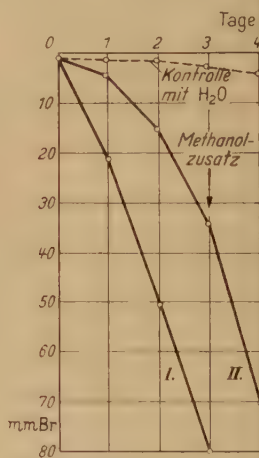


Abb. 16.

Abb. 16. Druckabnahme während der Atmung von *Hyphomicrobium*; 2% iges Methanol im Seitenansatz. Kontrolle mit H₂O; I und II sind Parallelansätze. Temperatur 28° C.

Mit den beiden Alkoholen wurden auch noch folgende Versuche angestellt: Etwa 500 cm³ Luft, die mit einer 1% igen Alkohollösung im Gleichgewicht standen, wurden unter Zwischenschalten eines Wattefilters durch die Reaktionsgefäße gedrückt. Somit stand *Hyphomicrobium* nach Verdrängen der gewöhnlichen Luft nur Alkoholdampf als Energiequelle zur Verfügung. Der Gaswechsel stieg, wie Abb. 19 und 20 zeigen, in den Versuchsgefäßen sehr schnell an, während sich in den Kontrollen, durch die normale Luft gedrückt war, kein Ansteigen zeigte.

In welcher Weise der Alkohol aufgenommen wird, ob durch die Kahlhaut als Dampf aus dem Gasraum oder erst als Lösung nach Übertreten in die flüssige Phase, kann nicht entschieden werden.

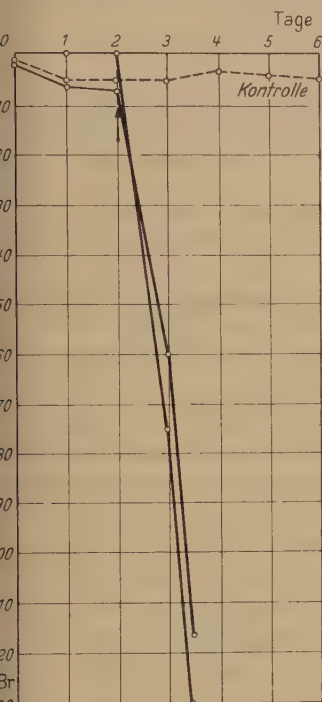


Abb. 17. Druckabnahme während der Atmung von *Hyphomicrobium* mit Hilfe einer Pipette; 5 cm³ Zellsuspension; Temperatur 30° C.

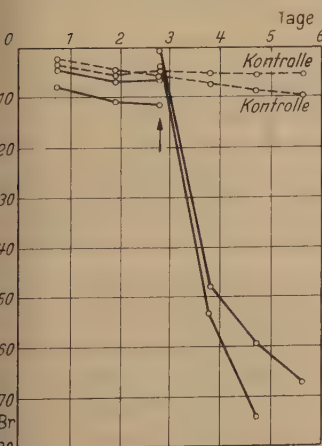


Abb. 19. Druckabnahme während der Atmung von *Hyphomicrobium*; Energiequelle: Methanol; 5 cm³ Zellsuspension in Stammlösung. Bei (↑) wurden durch den Reaktionstrog 500 cm³ Luft, die mit einer 1% igen Methanollösung im Gleichgewicht standen, geleitet.

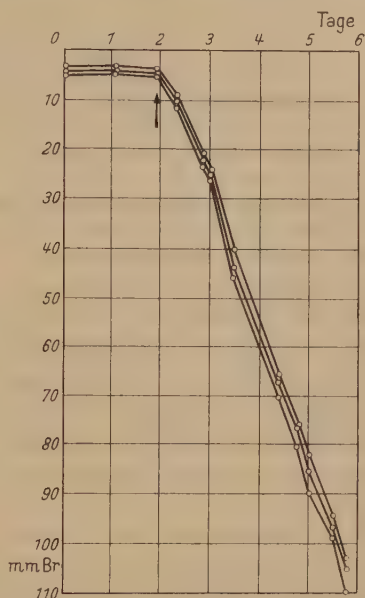


Abb. 18. Druckabnahme während der Atmung von *Hyphomicrobium*; bei (↑) Zugabe von 1 cm³ 1% Äthanol mit Hilfe einer Pipette; 5 cm³ Zellsuspension; Temperatur 30° C.

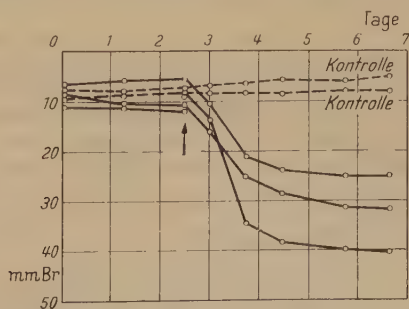


Abb. 20. Druckabnahme während der Atmung von *Hyphomicrobium*; Energiequelle: Äthanol; 5 cm³ Zellsuspension in Stammlösung. Bei (↑) wurden durch den Reaktionstrog 500 cm³ Luft geleitet, die mit einer 1% igen Äthanollösung im Gleichgewicht stand.

Energiequellen.

Bei Verwendung von flüchtigen Alkoholen als Energiequelle in der WARBURG-Apparatur wurde, wie erwähnt, beobachtet, daß sie bereits als Gas verwertet werden können. Deshalb wurden auch noch andere flüchtige organische Verbindungen geprüft.

Mehrere weithalsige Kulturkolben wurden mit rein mineralischer Nährlösung in einen Exsiccator gebracht, in dem sich ein Becherglas mit der jeweils zu prüfenden Substanz in wäßriger Lösung befand oder durch den das entsprechende Gas-Luft-Gemisch geleitet war. Als Kontrolle diente ein Exsiccator, in dem sich an Stelle der Substanzlösung destilliertes Wasser befand. Nach 3—10 Tagen wurde das Wachstum mikroskopisch geschätzt. Genauere quantitative Angaben ließen sich nach dieser Methode nicht machen.

Auf dem Weg über die Gasphase können danach außer Methanol und Äthanol noch Formaldehyd und wahrscheinlich auch Methan, Chloroform, Leuchtgas und Essigsäure das Wachstum von *Hyphomicrobium* unterhalten, während Acetaldehyd, Propionsäure, Isobutylalkohol, n-Butylalkohol, Butylacetat, Benzol, Benzaldehyd und anscheinend auch Ameisensäure hierzu nicht in der Lage sind. Diese Versuche hatten aber nur orientierenden Charakter, und ihre Ergebnisse sind daher nicht endgültig.

In weiteren Versuchen prüfte ich die quantitative Ausbeute an *Hyphomicrobium* auf den flüchtigen Energiequellen, die sich als besonders geeignet für das Wachstum erwiesen hatten. Das Auszählen der Proben in einer Zählkammer war, da die Zellen mit ihren Hyphen mehr oder weniger zu einer Haut verfilzen, unmöglich. Die Bestimmung des Kohlenstoffs, wie in den weiter unten angeführten Versuchen, war für den vorliegenden Zweck zu zeitraubend und daher nicht durchführbar. Es wurde schließlich das Trockengewicht als Vergleichsmaß verwendet.

Ein 250 cm³-Becherglas mit 25 cm³ der mineralischen Nährlösung stand auf einem Glasgestell in einem 1000 cm³ Weckglas, dessen Schliff zur Abdichtung mit Silicone (DC 44-leicht) eingerieben und dessen Deckel mit einer Feder befestigt war. Die üblichen Gummiringe mußten ausgeschaltet werden, da ihr Verhalten gegenüber Dämpfen org. Verbindungen nicht bekannt war. Sterilisation im Autoklaven 30 min im strömenden Dampf. Ähnlich wie bei den Exsiccatorversuchen wurden 10 cm³ einer wäßrigen Lösung der zu untersuchenden Substanz mittels einer sterilen Pipette auf den Boden des Weckglases gegeben und die Nährlösung mit einer Platinöse beimpft.

Bei makroskopischer Betrachtung schien sich die Kulturflüssigkeit am dritten Tag nach Beimpfen plötzlich zu trüben. Es zeigte sich aber, daß *Hyphomicrobium* in erster Linie als dichte Kahmhaut auf der Oberfläche der Nährlösung wuchs, ferner auch als Film an den Wänden der Bechergläser unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche; dies war die Ursache der „Trübung“. Die Nährlösung selbst war fast frei von Organismen. Der Inhalt eines Becherglases wurde nach 8—10 Tagen abzentrifugiert, zweimal mit dest. Wasser gewaschen und bei 60° C im Vakuumtrocken-

schränk bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Ergebnis dieser Versuche zeigt Tab. 2. Methanol stellt also anscheinend die günstigste Energiequelle für *Hyphomicrobium* dar. Bei den 1-C-atomigen Verbindungen dürfte die Reihenfolge des Wachstums Methanol > Formaldehyd > Ameisensäure sein. Die Trockengewichte auf $\frac{1}{100}$ mol Methanol und $\frac{1}{100}$ mol Formaldehyd — die allein vergleichbar sind — verhalten sich wie 1,8 : 1, also fast wie die Verbrennungswärmen. Die Ausbeute ist bei Methanol am günstigsten.

Tabelle 2. *Eignung flüchtiger Kohlenstoffverbindungen für Hyphomicrobium.*

Kulturdauer in Tagen	Energiequelle	Konz. mol	cm ³	Verbrennungswärme kcal/mol	Trocken- gew. mg	Ausbeute %
7	Methanol	$\frac{1}{10}$	10	182,6	7,8	26
7	„	$\frac{1}{10}$	10	182,6	8,0	26,5
8	„	$\frac{1}{10}$	10	182,6	7,3	24,1
13	„	$\frac{1}{100}$	10	182,6	1,6	52
10	„	$\frac{1}{100}$	10	182,6	1,5	50
10	„	$\frac{1}{100}$	10	182,6	1,5	50
10	Formaldehyd	$\frac{1}{10}$	10	134,1	kein Wachstum	
8	„	$\frac{1}{100}$	10	134,1	0,8	26,5
18	„	$\frac{1}{100}$	10	134,1	0,8	26,5
10	Ameisensäure	$\frac{1}{10}$	10	69,4	0,1	3,3
10	„	$\frac{1}{10}$	10	69,4	0,08	2,7
6	Äthanol	$\frac{1}{10}$	10	372,8	0,6	1
10	„	$\frac{1}{10}$	10	372,8	0,6	1
10	„	$\frac{1}{100}$	10	372,8	0,4	6,2
10	„	$\frac{1}{100}$	10	372,8	0,5	8,7

Als nicht mehr daran zu zweifeln war, daß *Hyphomicrobium* eine ganze Anzahl einfachster organischer Stoffe unter Sauerstoffaufnahme zu oxydieren vermag, interessierte vor allem die Frage, wieviel Kohlenstoff in die Substanz der Zellen eingebaut wird. Dabei wurde zunächst vorausgesetzt, daß dieser zelleigene Kohlenstoff tatsächlich dem von außen gebotenen organischen Substrat entnommen wird. Wir werden weiter unten noch sehen, daß diese Voraussetzung keineswegs gesichert erscheint. Da sich Methanol als hervorragend geeignetes Substrat erwies, setzte ich die folgenden Versuche nur noch mit ihm an.

In die bereits oben erwähnten Weckgläser wurde eine bekannte Menge — meist 5 bzw. 10 cm³ — einer 1% igen Methanollösung gegeben, bzw. als Kontrolle die gleiche Menge dest. Wasser. Bereits makroskopisch war nach wenigen Tagen eine deutliche Abstufung des Wachstums zwischen den Kontrollen, der einfachen und der doppelten Methanolmenge zu

erkennen. Nach einigen Tagen wurde der Kohlenstoff des Becherglasinhaltes nach der von ENGEL (1941) und BÖMEKE (1951) angegebenen Weise auf nassem Wege durch Verbrennen mit Chromschwefelsäure be-

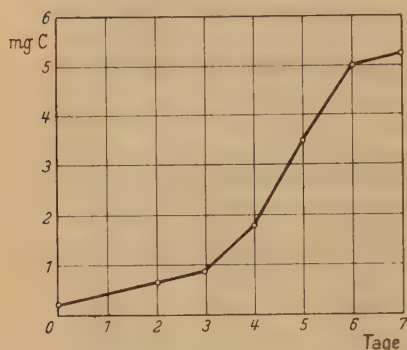


Abb. 21. Wachstum von *Hyphomicrobium*;
Energiequelle: 5 cm³ Methanol 1%;
Temperatur 37° C; p_H = 7,2.

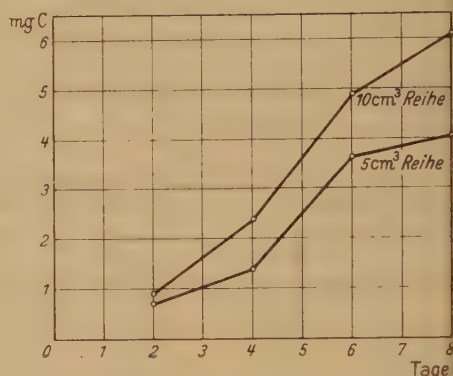


Abb. 22. Wachstum von *Hyphomicrobium*; Energiequelle: 5 bzw. 10 cm³ Methanol 1%;
Temperatur 37° C.

stimmt. Nach anfänglichen Mißerfolgen zeigte sich, daß vor der Kohlenstoffbestimmung die Bechergläser zunächst 1½ Std in einen Vacuumtrockenschrank bei 75° C und 0,95 kg/cm² Unterdruck gebracht werden

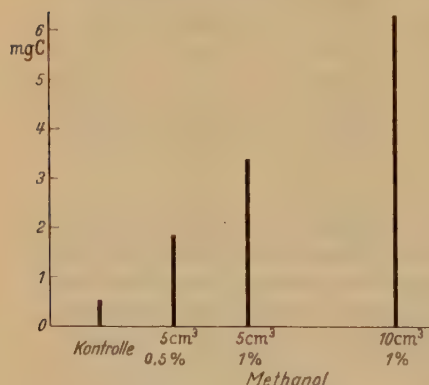


Abb. 23. In *Hyphomicrobium* eingebauter Kohlenstoff (Mittelwerte aus je 3 Bestimmungen). Energiequelle: 5 bzw. 10 cm³ Methanollösung; beimpft: 23. 1. 52 bzw. 28. 5. 52; C-Best.: 3. 2. 52 bzw. 31. 5. 52; Temperatur 37° C.

mußten, um etwa noch vorhandenes Methanol zu entfernen, das bei der Bestimmung die gefundenen Werte verfälschte. Die Zunahme der Kohlenstoffmenge in Abhängigkeit von der Zeit geht deutlich aus Abb. 21 hervor. Die Kurve stellt eine typische Wachstumskurve dar, deren Abklingen nach etwa 8 Tagen durch den völligen Verbrauch des Methanols bedingt ist. Etwa 30% des in Form von Methanol in die Weckgläser gegebenen Kohlenstoffs wurden in den Bechergläsern wiedergefunden. Selbst wenn man annimmt, daß die am ersten Tage gefundenen Kohlenstoffmengen auf Verunreinigungen der Nährsalze zurückzuführen sind, ändert sich an dieser Zahl praktisch nichts.

In einer weiteren Versuchsserie sollte festgestellt werden, ob durch Verdoppelung der Methanolmenge, bei gleichbleibender Konzentration

derselben (Abb. 22, 23), auch ungefähr eine Verdoppelung der Kohlenstoffausbeute zu beobachten war.

Jetzt erkennt man, daß unter Berücksichtigung der Kontrollen (Ansätze ohne Methanol) die Beziehung zwischen Kohlenstoff in der gegebenen Energiequelle und Kohlenstoff in *Hyphomicrobium* ungefähr eine lineare ist. Hierdurch könnte der Eindruck erweckt werden, als ob *Hyphomicrobium* seinen Kohlenstoffbedarf allein aus dem Methanol gedeckt habe. Ob dies zutrifft, soll aber erst entschieden werden, wenn die Frage untersucht wird, welche Bedeutung die Kohlensäure im Stoffwechsel von *Hyphomicrobium* spielt. Wir sahen ja bereits, daß in Abwesenheit von CO_2 keine Sauerstoffaufnahme und daher wahrscheinlich auch kein Abbau des organischen Substrates möglich ist.

Bedeutung des freien Kohlendioxyds.

Bereits die manometrischen Versuche hatten die auffällige Tatsache ergeben, daß das Wachstum von *Hyphomicrobium* bei Entzug des freien Kohlendioxyds sistiert wird. Der Organismus braucht offenbar dieses Gas, um normal leben zu können. Um in dieser Frage ganz sicher zu gehen, setzte ich folgende Versuche an:

Am 14. 2. 51 wurden 8 ERLÉNMEYER-Kolben mit 0,1% iger Na-Formiat-Nährlösung, am 23. 2. 51 weitere 8 Kolben mit 0,1% iger Ammoniumoxalat-Nährlösung und als Wiederholung der ersten Serie am 24. 2. 51 erneut 8 Kolben mit 0,1% iger Na-Formiat-Nährlösung beschickt und mit *Hyphomicrobium* beimpft. Jeweils 4 Kolben wurden in einem Exsiccator über etwa 15% iger Kalilauge untergebracht, während die restlichen 4 Kolben jeweils als Kontrolle (ohne KOH) dienen.

Nach einem Aufenthalt von einer Woche im Brutschrank bei 37° C zeigte sich bei mikroskopischer Beobachtung in den CO_2 -Mangelkolben kein Wachstum, während sich *Hyphomicrobium* in den Kontrollen stets vermehrte. Der pH -Wert in den Kolben über Kalilauge schwankte zwischen 6,8 bis 7,2, während er in den Kontrollen bis 7,6 anstieg. Dieser höhere pH -Wert in den Kontrollkolben beruhte höchstwahrscheinlich auf der physiologisch alkalischen Reaktion des Na-Formiates bzw. Ammoniumoxalates. Er bestätigte gewissermaßen den mikroskopischen Befund insofern, als eine Reaktionsverschiebung auf physiologischer Grundlage nur möglich ist, wenn Wachstum, verbunden mit Abbau der organischen Säuren, stattfindet. Da in Gegenwart von Kalilauge im Exsiccator keine nennenswerte Reaktionsverschiebung stattfand, kann daraus geschlossen werden, daß hier ein Wachstum nicht möglich war. Ursache kann nur der CO_2 -Mangel sein.

Trotzdem sollte der Nachweis der Notwendigkeit freien Kohlendioxyds für das Wachstum von *Hyphomicrobium* auch noch auf einem anderen Wege erbracht werden.

Durch die Kulturen wurde ein ständiger, mit Hilfe von Kalilauge und Barytwasser CO_2 -frei gemachter Luftstrom geschickt, der bei den ersten Versuchsreihen

in der Apparatur durch Unterdruck erzeugt, später mittels eines Kompressors durch die Waschflaschen gedrückt wurde. Hierbei fallen kleinste Undichtigkeiten in der Apparatur, die selbst bei Verwendung von Vacuumschläuchen und Schliffen leicht auftreten können, nicht ins Gewicht. Der Luftstrom betrug etwa 6 l/Std. Zur besseren Luftverteilung fanden sich in den Kulturkolben sowie einem Teil der Waschflaschen Schott-Glasfritten G 1. Beimpft wurden die Versuchskolben mit 0,5 bzw. 1,0 cm³ einer gut wachsenden, nicht zu alten Kultur.

In allen Fällen zeigte *Hyphomicrobium* im CO₂-freien Luftstrom praktisch kein Wachstum, während es sich bei Durchleiten von CO₂-haltiger Luft stark vermehrte. Das Ansteigen der pH-Werte der Kontrollen (auf 7,0—8,0) im Gegensatz zu den CO₂-Mangelreihen (auf 6,8—7,8) konnte auch hier, wenngleich nicht so ausgeprägt wie in den Exsiccatorversuchen, beobachtet werden. Wurde dagegen ein schwächerer Luftstrom, etwa 0,5 l/Std, durch die Gefäße geschickt, so kam es zu mehr oder weniger starker Zellvermehrung auch im CO₂-freien Luftstrom. Dies Phänomen läßt sich vielleicht so erklären, daß das von den eingepfropften Organismen aus der Ameisensäure der Nährlösung gebildete Kohlendioxyd ausreichte, um den CO₂-Bedarf der Kultur zu decken. Diese Kohlensäure wurde den Zellen nicht, wie bei starker Belüftung, wieder entzogen.

Ähnliches beobachtete FARGHALY (1950) bei Leuchtbakterien. Er fand, daß *Achromobacter Fischeri* in Abwesenheit von CO₂ weder wuchs noch leuchtete. Durch Zusatz bestimmter Aminosäuregemische konnte diese Hemmung aufgehoben werden, aber nur dann, wenn der Strom CO₂-freier Luft nicht zu stark wurde.

CO₂-Assimilation.

Die Kohlensäure spielt also irgendwie eine lebensnotwendige Rolle im Stoffwechsel von *Hyphomicrobium*. Damit sind die in den letzten Jahren sich häufenden Beobachtungen über die Notwendigkeit dieses Gases oder zumindest über die Möglichkeit seiner Verwertung durch Mikroorganismen (RABINOWITSCH 1945, RIPPEL-BALDES 1952) um eine weitere bereichert worden. Es fragt sich nun, ob die Kohlensäure unmittelbar in den Stoffwechsel eingreift oder nur durch ihre Gegenwart wirkt.

So könnte *Hyphomicrobium* einen ähnlichen Stoffwechsel wie die „echten“ autotrophen Bakterien besitzen. Die organische Substanz könnte als Energiequelle dienen, während der Kohlenstoff der Zellsubstanz durch Reduktion der atmosphärischen Kohlensäure gewonnen wird, ähnlich wie bei den methanoxydierenden Bakterien (SÖHNGEN 1906), bei denen bekanntlich der klassische Begriff der Chemo-Autotrophie zuerst gesprengt wurde. Die Wärmetönung der von *Hyphomicrobium* durchgeführten Oxydationen organischer Stoffe sind so beträchtlich, daß ein Teil dieser Energie wie bei der anorganischen Chemosynthese zur Reduktion der atmosphärischen Kohlensäure dienen könnte. Als Wasserstoffdonator könnte entweder ein Teil der organischen Substanz oder, in Parallele zur Photosynthese und vermutlich auch der anorganischen Chemosynthese (z. B. bei den Salpeterbakterien), das Wasser dienen. Ferner besteht die Möglichkeit (RABINOWITSCH 1945), daß ein Teil der organischen Substanz direkt für die heterotrophe Assimilation benötigt wird, während der Rest als Energielieferant Verwendung findet. Seit langem ist

z. B. von den *Athiorhodaceen* bekannt, daß bei ihnen die Grenze zwischen Autotrophie und Heterotrophie verwischt ist. Organische Stoffe — wie Fettsäuren, Alkohole usw. — dienen als Wasserstoffdonatoren bei der Reduktion der Kohlensäure, welche zur Synthese der Körpersubstanz verwendet wird, sie werden aber selbst nicht zum Aufbau zelleigener Substanz benutzt.

Weiterhin könnte die Bindung von CO_2 entsprechend der WOOD-WERKMAN-Reaktion stattfinden. WOOD u. WERKMAN (1942) fanden, daß z. B. Propionsäurebakterien in der Lage sind, aus Glycerin unter Aufnahme von CO_2 (auf dem Weg über Brenztraubensäure) Bernsteinsäure zu bilden. Die Kondensation von Brenztraubensäure (einer 3-Kohlenstoffverbindung) mit CO_2 zu Oxalessigsäure, die zu einem Teil zu Bernsteinsäure reduziert wird (beides 4-Kohlenstoffverbindungen), scheint allgemein verbreitet zu sein, so z. B. bei *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Hefe* usw., aber auch bei höheren Pflanzen. Ein ähnlicher Reaktionstyp, bei dem CO_2 gebunden wird, wurde von LIPMANN u. TUTTLE (1945) beschrieben. Es ist die Umkehr der oxydativen Decarboxylierung von Brenztraubensäure in Gegenwart von anorganischen Phosphorverbindungen. Schließlich fand OCHOA (1945 u. 1948) eine enzymatische Carboxylierung, bei der Triphospho-Pyridin-Nukleotid (TPN) eine wesentliche Rolle spielt und die bekannte Decarboxylierung von Isocitronensäure zu α -Ketoglutarensäure umgekehrt wird.

Welcher der hier aufgezeigten Wege der Verwendung der Kohlensäure von *Hyphomicrobium* beschritten wird, bleibt einstweilen unbekannt. Es könnte zudem — wie bereits erwähnt — möglich sein, daß die Kohlensäure hier nicht direkt in den Stoffwechsel eingreift, sondern lediglich durch ihre Anwesenheit wirkt, etwa als Austausch-Anion oder zur Aufrechterhaltung des Plasmagefüges u. a. Was zunächst einmal geprüft werden mußte, war die Frage, ob der Kohlenstoff des CO_2 überhaupt eingebaut wird oder nicht. Der Lösung dieses Problems kommt man näher, wenn es gelingt, den Weg des Kohlenstoffs der organischen Substanz und den des Kohlendioxyds getrennt voneinander zu verfolgen. Bekanntlich ist dies mit Hilfe von markiertem Kohlenstoff durchführbar, eine Möglichkeit, die in den kurzlebigen ^{11}C , dem stabilen ^{13}C und dem langlebigen ^{14}C gegeben ist.

Bei Versuchen mit radioaktiven Stoffen ist zunächst die Frage zu beantworten, inwieweit eine hierbei auftretende Strahlung die physiologischen Eigenschaften der Zellen beeinflusst. Man könnte geneigt sein, Vergleiche mit UV-Licht und Röntgenstrahlen anzustellen, bei denen es bekanntlich zu Schädigungen kommt. Nach KAMEN (1948) wird aber bei solchen Einwendungen übersehen, daß die Strahlung von Isotopen im wesentlichen nicht von außen her an den Organismus herantritt. Nach ihm sind bei den in der „Tracer-Methodik“ üblichen Konzentrationen von ^{14}C keine physiologischen Störungen zu erwarten. Genauere Angaben einer verträglichen Bestrahlungsdosis liegen allerdings nicht vor. Auch meine im folgenden aufgeführten Versuche zeigen, daß eine Strahlungsschädigung anscheinend nicht auftritt.

Bei diesen Versuchen arbeitete ich mit der radioaktiven Kohlenstoffisotope ^{14}C . ^{14}C ist ein reiner β -Strahler mit einer Maximalenergie von 0,156 MeV. Der Energieabfall kann, da die Versuchsdauer im Verhältnis zur Halbwertszeit von ^{14}C (etwa

6300 Jahre) sehr klein ist, vernachlässigt werden. ^{11}C war wegen seiner kurzen Lebensdauer nicht verwendbar, während ^{13}C nicht so geeignet erschien, weil sein Auffinden nur mit Hilfe des Massenspektrographen erfolgen kann. Die radioaktiven Isotope können hingegen durch die bei ihrem Zerfall emittierte Strahlung leicht nachgewiesen werden.

Die Messung der Aktivität erfolgte mit dem GEIGER-MÜLLER-Strahlungsmeßgerät FH 44 und einem Glockenzählrohr FHZ 15 mit Glimmerfenster $1,6 \text{ mg/cm}^2$ der Firma Friesseke u. Hoepfner, Erlangen-Bruck.

Der erste Versuch sollte die Frage klären, ob das zum Wachstum von *Hyphomicrobium* notwendige Kohlendioxyd in die Zellen eingebaut oder lediglich lose angelagert oder sonstwie durch seine Gegenwart wirksam wird. Es mußte also *Hyphomicrobium* in einer C^*O_2 -haltigen Atmosphäre gezüchtet und anschließend festgestellt werden, ob sich radioaktiver Kohlenstoff in den Bakterienzellen nachweisen ließ.

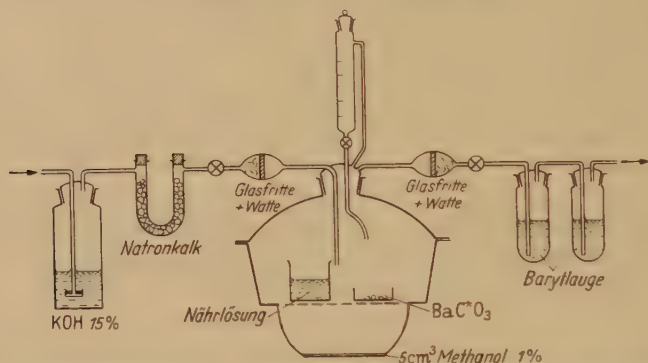


Abb. 24. Apparatur zur Züchtung von *Hyphomicrobium* in einer C^*O_2 -haltigen Atmosphäre.

In einem Exsiccator von 5500 cm^3 Fassungsvermögen befinden sich ein Becherglas mit 25 cm^3 rein mineralischer Nährlösung sowie eine Schale mit 25 mg radioaktivem Bariumcarbonat (etwa $0,1 \text{ mg C}^*$), aus welchem durch Zusatz von $15 \text{ cm}^3 \text{ n/5}$ Schwefelsäure C^*O_2 freigemacht werden konnte (Abb. 24). Vor Versuchsbeginn wurde die gesamte Apparatur im Autoklaven sterilisiert und, nachdem die Nährlösung beimpft worden war, der Exsiccator mittels Durchleitens ($\frac{1}{2}$ Std) von CO_2 -freier Luft CO_2 -frei gemacht. Jetzt wurden mit Hilfe der aufgesetzten Bürette $15 \text{ cm}^3 1\%$ iges Methanol auf den Boden des Exsiccators gegeben und anschließend durch Zugabe von H_2SO_4 aus BaC^*O_3 das aktive C^*O_2 freigemacht. Nach 8–14 Tagen Wachstum — die gesamte Apparatur befand sich während dieser Zeit im Brutschrank bei 37°C — entfernte ich das aktive C^*O_2 mittels Durchleitens von Luft wieder aus dem Exsiccator und fing es in Barytlauge auf. Nach Prüfung der angewachsenen Kultur auf Reinheit durch Abimpfen auf Fleischextraktbrühe und Hefewasser wurden die Bakterien bei 5000 Umdr./min abzentrifugiert und durch Aufschlämmen und erneutes Zentrifugieren einmal mit $20 \text{ cm}^3 0,5\%$ iger Phosphorsäure sowie dreimal mit 20 cm^3 Aqua bidest. gewaschen, auf Messingschälchen (innerer $\varnothing 15 \text{ mm}$) gebracht und im Vakuumtrockenschrank bei 70°C und $-0,95 \text{ kg/cm}^2$ Druck getrocknet. Es mußte darauf geachtet werden, daß die Bakterien möglichst gleichmäßig auf den Schälchen verteilt waren. 2 cm^3 der Nährlösung bzw. der verschiedenen Fraktionen des Waschwassers wurden auf Uhrgläsern, $\varnothing 70 \text{ mm}$, im Trockenschrank eingedampft; der Rückstand wurde auf Aktivität geprüft.

Wie aus den Versuchsergebnissen hervorgeht (Tab. 3), zeigen die Bakterien, die in einer C*O₂-haltigen Atmosphäre gezüchtet wurden, eine recht beachtlich hohe Impulszahl, die sich auch durch wiederholtes Auswaschen mit Wasser nicht entfernen läßt. Damit ist gezeigt, daß von *Hyphomicrobium* CO₂ aus der Luft aufgenommen und irgendwie festgelegt wird. Die weitere Frage war jetzt, ob ein Einbau des CO₂ in die Zellen erfolgte oder ob es lediglich adsorptiv gebunden wird. Um dies zu klären, stellte ich Versuche an, bei denen die Aktivität der Organismen nicht insgesamt, sondern die einzelnen Bausteine von *Hyphomicrobium* getrennt auf ihre Aktivität geprüft wurden.

Tabelle 3. Aufnahme von ¹⁴C durch *Hyphomicrobium*.

Beimpft am:	Abzentrif. am:	<i>Hypho- microbium</i>		Nährlös. (2 cm ³) Imp./ min	Phosphor- säure 0,5 % (2 cm ³) Imp./min	Waschwasser (2 cm ³)			Null- effekt Imp./ min
		Aktivi- tät Imp./ min	Trocken- gew. mg			1. Imp./ min	2. Imp./ min	3. Imp./ min	
17. 5. 52	26. 5. 52	45000	14,0	7200	—	360	170	100	35
29. 5. 52	6. 6. 52	40000	13,5	3150	1000	360	315	290	265

Die abzentrifugierten und gewaschenen Bakterien wurden zur Zerstörung der Zellen zusammen mit einem Rest Wasser vorsichtig 5 oder 6 mal bei —5° C langsam eingefroren und bei +30° C wieder aufgetaut. Anschließend entfettete ich sie 3 mal hintereinander mit insgesamt 10 cm³ Alkohol-Äther 3:1 bei 50° C zur Herauslösung etwa vorhandener Lipide. Die Lösung wurde im Wägegias eingedampft und auf Aktivität geprüft. Den Bakterienrückstand unterwarf ich einer 8stündigen Hydrolyse mit 4 cm³ rauchender Salzsäure bei 130° C auf dem Paraffinbad, die anschließend durch Vakuumdestillation bis zur Trockne bei 50° C und 17 mm Hg wieder entfernt werden mußte. Der nach Fleischextrakt riechende Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, auf ein Uhrglas übergeführt, abgedampft und erneut in 0,5 cm³ Wasser gelöst. Um die im Alkohol-Äther-Extrakt sowie im Hydrolysat enthaltenen Stoffe voneinander zu trennen, ließ ich mehrere zweidimensionale Papierchromatogramme laufen. Als Papier fand „Schleicher und Schüll 2043b“ 40×40 cm Verwendung. Auf den Startpunkt brachte ich mit einer Mikropipette jeweils 0,015 cm³ des Extraktes bzw. Hydrolysates auf. Das Lösungsmittel des Chromatogrammes war Butanol-Eisessig-Wasser (9:1 Vol.-Teile + Wasser bis zur Trübung, die durch einen Tropfen Eisessig wieder zum Verschwinden gebracht wird) für die eine Richtung, Pyridin-Amylalkohol-Wasser (7:7:6) für die andere. Die Laufzeit betrug 30 bzw. 48 Std. Es wurde absteigend bei 17° C chromatographiert. Nach dem Trocknen im Trockenschrank wurde eines der Chromatogramme mit Ninhydrin als Reagens auf Aminosäuren entwickelt. Es zeigten sich nach ½ Std bei 60° im Trockenschrank blauviolette sowie einige rötliche Flecke. Zur Orientierung war in diesem Chromatogramm 0,001 cm³ l-Prolinlösung mitgelaufen, die nach dem Entwickeln einen gelben Fleck hinterließ. Da die Färbung der Aminosäuren mit Ninhydrin nur wenige Tage haltbar ist, photographierte ich die Chromatogramme (Abb. 25)¹.

¹ Herrn Dr. W. WALTER danke ich für die Deutung dieses Chromatogrammes.

Das erstaunliche an dem Chromatogramm ist die stattliche Zahl von mindestens 16 verschiedenen Aminosäuren. Obwohl nur einfachste organische Energiequellen und CO_2 genügen, um das Leben von *Hyphomicrobium* sicherzustellen, baut es sich ein Aminosäuregemisch auf, das in seiner Vielseitigkeit dem höher stehender Organismen in nichts nachsteht.

Ein zweites Chromatogramm wurde zur Entwicklung der Zucker mit Anilinphtalat gesprüht. Zucker konnten aber nicht nachgewiesen werden. Es sei in diesem Zusammenhang noch einmal darauf hingewiesen, daß Zucker in der WARBURG-Apparatur von *Hyphomicrobium* nicht ver-

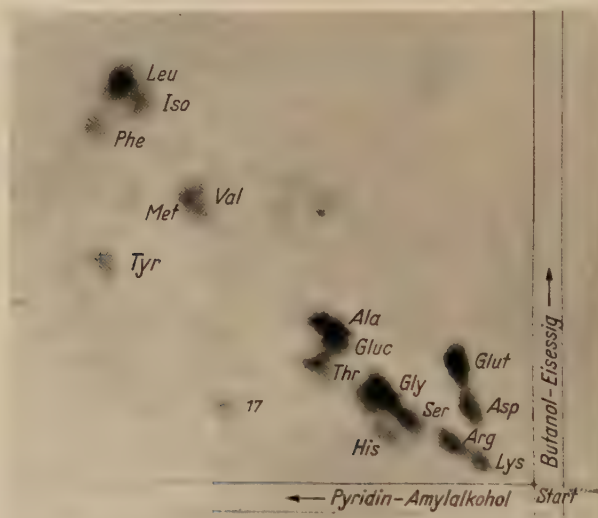


Abb. 25. Papierchromatogramm des Hydrolysates, entwickelt mit Ninhydrin.

Ala	Alanin	Lys	Lysin
Arg	Arginin	Met	Methionin
Asp	Asparaginsäure	Phe	Phenylalanin
Gluc	Glucosamin?	Ser	Serin
Glut	Glutaminsäure	Thr	Threonin
Gly	Glykokoll	Tyr	Tyrosin
His	Histidin	Val	Valin
Iso	Isoleucin	Nr. 17	unbekannt
Leu	Leucin		

arbeitet wurden. Ob zwischen diesen beiden Beobachtungen allerdings ein Zusammenhang besteht — insofern, als die eine eine Bestätigung für die andere ist —, kann heute noch nicht entschieden werden.

Ein drittes Chromatogramm sollte, entsprechend den Angaben von MARKHAM u. SMITH (1949), nach dem Photoprintverfahren mit UV-Licht von $260\text{ m}\mu$ durchstrahlt und auf Fotopapier kopiert werden. Leider trat, trotz langer Belichtungszeiten, überhaupt keine Schwärzung ein. Wahrscheinlich hängt dies mit dem Lösungsmittelgemisch zusammen, welches Pyridin enthält. Falls von diesem — oder dessen Salz mit Essigsäure — noch Reste in dem Papier sind, besteht die Möglichkeit, daß es nicht mehr UV-durchlässig ist.

Wird C^*O_2 in den Stoffwechsel einbezogen und sein Kohlenstoff als Baustein für irgendwelche Zellbestandteile verwendet, so mußte die Prüfung der Chromatogramme auf Aktivität mit Hilfe des GEIGER-MÜLLER-Zählrohres an irgend einer Stelle, wenn nicht gar im gesamten Bereich des Chromatogrammes, positiv ausfallen, negativ dagegen, wenn C^*O_2 kein Baumaterial ist. Die Untersuchung der aus dem Papierchromatogramm geschnittenen Flecke sowie des übriggebliebenen Papiers ergab folgendes Bild (Tab. 4).

Tabelle 4. *Einbau von ^{14}C in Aminosäuren von *Hyphomicrobium*.*

Versuch vom: 7. 7. 52		18. 7. 52
Alanin	157	320 Imp./min
Arginin	160	316 "
Asparaginsäure . .	150	384 "
Glukosamin ? . . .	215	320 "
Glutaminsäure . .	195	430 "
Glykokoll	92	316 "
Histidin	94	322 "
Isoleucin	50	120 "
Leucin	58	121 "
Lysin	78	180 "
Methionin	33	30 "
Phenylalanin . . .	74	128 "
Serin	68	100 "
Threonin	126	305 "
Tyrosin	129	131 "
Valin	50	101 "
Nr. 17	86	75 "
Leerstellen	30	26 "
Nulleffekt	19	26 "

Die Werte sind Mittelwerte aus mehreren Messungen.

Es sei bezüglich der Zahlen in der Tabelle noch darauf hingewiesen, daß — wie WEYGAND (1952) betont — bei der Strahlungsmeßtechnik durch direktes Auszählen keine hohen Impulszahlen erwartet werden können, da bei den energiearmen β -Teilchen die Selbstabsorption des Papierses sehr groß ist.

Sämtliche auf dem Chromatogramm gefundenen Aminosäuren waren aktiv, denn ihre Impulszahlen übertreffen die der Leerstellen zum Teil um ein Vielfaches. Daraus geht mit Sicherheit hervor, daß der Kohlenstoff des CO_2 in die Körpersubstanz der Zellen eingebaut wurde, im vorliegenden Falle in die Bausteine des Eiweiß. Überraschend an dem Ergebnis war das Auftreten erhöhter Aktivität in sämtlichen Aminosäuren. Hieraus kann man den Schluß ziehen, daß der Kohlenstoff des CO_2 den gesamten Aufbau des Zelleiweiß beherrscht, wahrscheinlich steht er am Anfang desselben.

Außerdem prüfte ich auch die bei der Aufbereitung der Bakterien gewonnenen Extrakte, Waschwasser usw. auf ihre Aktivität (Tab. 5).

Tabelle 5. Verteilung von ^{14}C in *Hyphomicrobium*-Kulturen.

Versuch vom:	7. 7. 52	18. 7. 52	4. 8. 52
Nährlösung (2 cm ³)	11 000	4470	5900 Imp./min
Waschwasser 1 (2 cm ³)	1300	310	430 „
„ 2 (2 cm ³)	445	240	375 „
„ 3 (2 cm ³)	410	195	275 „
Alkohol-Äther-Extrakt	14550	16500	11450 „
Hydrolysats	22000	19000	21000 „
Nulleffekt	10	26	25 „

An dem Ergebnis interessierte besonders die hohe Aktivität des Alkohol-Äther-Extraktes. Sie zeigt, daß außer den Aminosäuren auch noch andere Stoffe synthetisiert werden (Lipoide?), in welche der Kohlenstoff des CO_2 eingeht.

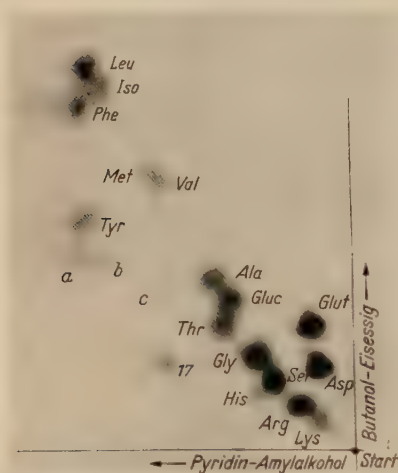


Abb. 26.



Abb. 27.

Abb. 26. Radioautogramm eines Papierchromatogrammes des Hydrolysates. Abkürzungen der Aminosäuren wie in Abb. 25. *a*, *b* und *c* Flecken unbekannter Herkunft (Purine?).

Abb. 27. Radioautogramm eines Papierchromatogrammes des Alkohol-Äther-Extraktes.

Um die Flecken höherer Aktivität des Papierchromatogrammes noch einwandfreier als mit dem Zählrohr lokalisieren zu können und um festzustellen, ob außer den Aminosäuren noch weitere Stoffe mit höherer Aktivität in den Chromatogrammen gelaufen waren, wurde ein Autoradiogramm angefertigt, ähnlich den Angaben von CALVIN u. Mitarb. (1951). Zwischen zwei Hartfaserplatten — besser eigneten sich noch Glasplatten — wurde auf das trockene Papierchromatogramm ein Agfa-Röntgenfilm für 10 Tage gepreßt. Er zeigte nach dem Entwickeln das gleiche Bild wie das anschließend auf Aminosäuren entwickelte Papierchromatogramm (Abb. 26).

Außer den als Aminosäuren identifizierten Flecken fanden sich jedoch noch drei Zonen (*a*, *b*, *c*) wesentlich geringerer Schwärzung, die bisher nicht gedeutet werden konnten und die vielleicht auf Purine zurückzuführen sind.

Das Radioautogramm des Papierchromatogrammes des Alkohol-Äther-Extraktes (Abb. 27) zeigte nur einen gewanderten Fleck, während sich weitere Aktivität nur auf dem Startpunkt fand. Daraus geht hervor, daß Purine und Aminosäuren mit Alkohol-Äther 3:1 nicht wesentlich aus den Zellen entfernt wurden. Welche Substanz dem gewanderten Fleck entspricht, muß dahingestellt bleiben. Lipaide dürften auf dem Startpunkt erscheinen, da sie in Butanol-Eisessig bzw. Pyridin-Amylalkohol unlöslich sind.

Bei einer weiteren Versuchsreihe sollte die CO₂-Aufnahme von *Hyphomicrobium* geprüft werden, nachdem dessen Vermehrungsphase abgeschlossen bzw. die Energiequelle verbraucht war. Es bestand immerhin die Möglichkeit, daß das CO₂ einfach durch Ionenaustausch oder auf Grund irgendeiner anderen nicht biochemischen Reaktion bzw. durch nachträgliche Umlagerung innerhalb der Körperbausteine in das Eiweißgerüst der Zellen eingedrungen war und sich dort festgesetzt hatte. In diesem Fall müßte auch nach Einstellung des Wachstums der Zellen (Verbrauch der Energiequelle) im Hydrolysat, bzw. in dessen Aminosäuren eine erhöhte Aktivität nachweisbar sein.

Eine 14 Tage alte, in einem Weckglas herangezogene Kultur wurde in den sterilisierten Exsiccator gebracht. Eine organische Energiequelle stand den Zellen nicht mehr zur Verfügung. Aus aktivem Bariumcarbonat wurde nun, wie bei den bisher beschriebenen Versuchen, C*O₂ entwickelt. Nachdem dieses 8 Tage auf *Hyphomicrobium* eingewirkt hatte, zentrifugierte ich die Zellen ab und arbeitete sie wie bereits beschrieben auf. Die Prüfung auf Aktivität ergab folgendes Bild (Tab. 6 und 7).

Tabelle 6. Aufnahme von ¹⁴C durch *Hyphomicrobium* nach Aufhören des Wachstums.

Versuch vom: 14. 7. 52		19. 8. 52
Nährlösung (2 cm ³) . . .	1820	5300 Imp./min
Waschwasser 1 (2 cm ³) .	60	132 „
„ 2 (2 cm ³) .	42	147 „
„ 3 (2 cm ³) .	48	127 „
„ 4 (2 cm ³) .	35	
Alkohol-Äther-Extrakt .	95	260 „
Hydrolysat	3210	2060 „
Nulleffekt	30	120 „

Nach Verbrauch der Energiequelle hatte *Hyphomicrobium* keine wesentlichen Mengen CO₂ mehr aufgenommen. Ein gewisser Anstieg der Aktivität im Hydrolysat war allerdings vorhanden, da eine geringe Vermehrung

der Zellen auf Grund der Zerfallsprodukte toter Zellen bzw. der Verunreinigungen der Luft usw. stets stattfindet. Aber dieser Anstieg war gering im Vergleich zu dem des in Tab. 7 wiedergegebenen Versuches. Das Ergebnis war gleichzeitig aber auch ein Beweis dafür, daß bei den vorher beschriebenen Versuchen *Hyphomicrobium* tatsächlich seine Körpersubstanz, zumindest zu einem wesentlichen Anteil, aus dem CO_2 der Luft aufgebaut hatte und der nachgewiesene aktive Kohlenstoff keineswegs allein auf Grund nicht biologischer Umsetzungen bzw. Reaktionen angelagert war.

Tabelle 7. Aufnahme von ^{14}C durch *Hyphomicrobium* nach Aufhören des Wachstums (Aminosäuren).

Versuch vom: 14. 7. 52			
Alanin	34 Imp./min	Methionin	27 Imp./min
Arginin	31 „	Phenylalanin	25 „
Asparaginsäure . .	27 „	Serin	25 „
Glukosamin . . .	30 „	Threonin	29 „
Glutaminsäure . .	25 „	Tyrosin	20 „
Glykokoll	28 „	Valin	18 „
Histidin	23 „	Nr. 17 (unbekannt) .	20 „
Isoleucin	29 „		
Leucin	31 „	Leerstellen	29 „
Lysin	25 „	Nulleffekt	27 „

Schlußbemerkungen.

Meine im vorstehenden geschilderten Untersuchungen haben viele Fragen offen lassen müssen. Obwohl die von *Hyphomicrobium* ausgebildeten Hyphen im Dienste der vegetativen Vermehrung stehen und gewisse Strukturen aufweisen, bleibt ihre Bedeutung unklar. Es ist nicht recht einzusehen, warum der Entwicklung eines Schwärmers die Bildung einer trägerartigen Hyphe vorausgehen soll, die sich gelegentlich auch verzweigen kann. Schwärmerbildung ist im gesamten Reich der Bakterien auch ohne Zwischenschaltung derartiger Hyphen möglich. Durch den Besitz dieser, der Zellvermehrung dienenden, hyphenartigen Gebilde entfernt sich *Hyphomicrobium* — systematisch gesehen — so sehr von den Bakterien, daß seine Zuordnung zu den *Eubacteriales* mehr als zweifelhaft erscheint. Betrachtet man dagegen die Hyphen nicht als Anhängsel, sondern als den eigentlichen Organismus, so könnte man zu einer wesentlich anderen Auffassung über die systematische Stellung von *Hyphomicrobium* kommen. Die Schwärmer könnte man als von den Hyphen gebildete bewegliche Sporen auffassen, die nach einer bestimmten Zeit zur Ruhe kommen und unter gegebenen Bedingungen mit neuen Hyphen auskeimen. Wir hätten damit einen sehr primitiven Pilz vor uns, dessen vegetative und reproduktive Phasen weitgehend reduziert und

vereinfacht sind. Es sei daran erinnert, daß schon STUTZER u. HARTLEB (1897) Fäden des von ihnen beschriebenen „*Salpeterpilzes*“ — eines Gemisches verschiedener Mikroorganismen einschließlich *Hyphomicrobium* — als Anlagen zu Mycelien auffaßten. Die Anschwellungen an ihren Enden sollten Chlamydosporen sein, die sich nach der Reife lösen.

Auch der Stoffwechsel von *Hyphomicrobium* bleibt noch in mancherlei Hinsicht problematisch. Insbesondere muß die Frage, ob die Einbeziehung der Kohlensäure in den Stoffwechsel auf chemosynthetischem Wege (autotroph) oder „heterotroph“ vor sich geht, offen bleiben. Manches spricht allerdings dafür, daß im vorliegenden Fall der erste Weg beschritten wird, so der vollständige Abbau der organischen Energiequellen bis zu CO_2 und H_2O und das in allen Fällen langsame Wachstum, eine Eigenschaft, die allen chemosynthetisch arbeitenden Bakterien eigen ist.

Auf die in der Einleitung aufgeworfene Frage, warum *Hyphomicrobium* so häufig in nitrifizierenden Kulturen angetroffen wird, sei an dieser Stelle noch einmal zurückgekommen. STEPHENSON (1950) vermutet geradezu eine Art von Symbiose. Untersucht man die Lebensansprüche beider Organismen genauer, so kommt man zu dem Ergebnis, daß sie in mancherlei Hinsicht übereinstimmen oder doch ähnlich sind. Beide oxydieren energiereiche Substanzen. Bei den Salpeterbakterien sind diese anorganischer, bei *Hyphomicrobium* organischer Natur. Es ist nicht ausgeschlossen, daß auch *Hyphomicrobium* wie die Salpeterbakterien mit Hilfe der Oxydationsenergie autotroph lebt. Beide stellen die Oxydation ein, sobald ihnen atmosphärische Kohlensäure entzogen wird. In der Natur kommen Ammoniak bzw. flüchtige, einfach gebaute organische Stoffe, wie sie von den Salpeterbakterien bzw. *Hyphomicrobium* oxydiert werden können, häufig gemeinsam vor. Beiden sind größere Mengen höhermolekularer organischer Stoffe, insbesondere Kohlenhydrate, entweder gleichgültig oder gar schädlich. Die Ansprüche an den pH-Wert der Nährlösung und an die Sauerstoffverhältnisse sind gleich.

Dies sind, bei aller Verschiedenheit in anderen Punkten, doch wesentliche Züge, die es begreiflich machen, warum beide so häufig vergesellschaftet vorkommen. Wenn es zudem zutreffen sollte, daß die nitrifizierenden Bakterien einen Teil ihrer organischen Assimilate in das Substrat ausscheiden, so wird das häufige Zusammenleben von *Hyphomicrobium* und *Nitrifikanten* noch verständlicher. Man könnte in diesem Zusammenhang sogar gewisse Rückschlüsse auf die Natur der Stoffausscheidungen der Salpeterbakterien ziehen. Es müssen jedenfalls sehr einfache Stoffe nach Art der Ameisensäure, Essigsäure usw. sein.

Zum Schluß sei noch kurz auf die Frage eingegangen, welche Rolle *Hyphomicrobium* im Stoffkreislauf der Natur spielt. Wir haben gesehen, daß es eine ganz besondere Vorliebe für flüchtige, einfach gebaute organische Stoffe hat, wie sie

bei der Verrottung und Fäulnis von pflanzlichen und tierischen Rückständen allgemein auftreten können. *Hyphomicrobium* ist wahrscheinlich unter Berücksichtigung dieser Tatsache wesentlich an der Beseitigung derartiger Stoffe in der Natur beteiligt. Da es weitverbreitet ist und sowohl im Boden als auch im Wasser gefunden wurde, dürfte es eine beträchtliche Rolle bei der Reinigung der Luft von derartigen Stoffen spielen. Schon RULLMANN (1898) vermutete ähnliches, als er dieser „Mikrobe“ große Bedeutung für die Selbstreinigung der Flüsse zuschrieb.

Zusammenfassung.

1. *Hyphomicrobium vulgare* St. et H. wurde aus verschiedenen Boden- und Wasserproben in Reinkultur gezüchtet; folgende Eigenschaften wurden an ihm festgestellt:
2. Sein Zellkörper und seine Hyphe besitzen Innenstrukturen, über deren Bedeutung allerdings nichts ausgesagt werden kann.
3. Mit Hilfe des Phasenkontrastverfahrens gelang es, die Schwärmerbildung an den Hyphen erstmalig in einem flüssigen Nährmedium zu verfolgen.
4. Aus dem in der WARBURG-Apparatur bestimmten Atmungsquotienten verschiedener organischer Substanzen (Formiat, Acetat, Glycerin) wurde geschlossen, daß *Hyphomicrobium* diese Stoffe unter O_2 -Aufnahme vollständig zu CO_2 und H_2O abbaut.
5. Es vermag ferner gasförmige, einfache, organische Verbindungen (Methanol, Äthanol, Formaldehyd) abzubauen, vermutlich ebenfalls bis zu CO_2 und H_2O .
6. Ohne Anwesenheit von Kohlensäure findet kein Wachstum statt.
7. Mit Hilfe radioaktiven Kohlenstoffs wurde nachgewiesen, daß CO_2 aus der Luft aufgenommen und der Kohlenstoff daraus in der Körpersubstanz eingebaut wird.
8. Die Natur der C-Assimilation — ob autotroph oder heterotroph — bleibt vorläufig ungeklärt. Es sind Hinweise dafür vorhanden, daß der Kohlenstoff des CO_2 chemosynthetisch verarbeitet wird.
9. Auch die systematische Stellung von *Hyphomicrobium* bleibt unklar. Manches spricht dafür, daß es als primitiver Pilz aufgefaßt werden muß.
10. Die häufige Vergesellschaftung mit Nitrifikanten beruht wahrscheinlich auf weitgehend übereinstimmenden Ansprüchen beider Organismen an das Nährsubstrat.
11. Im Kreislauf der Stoffe in der Natur spielt *Hyphomicrobium* anscheinend eine wesentliche Rolle bei der Reinigung der Luft und somit auch des Bodens und Wassers von flüchtigen, einfach gebauten organischen Stoffen.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. ENGEL, Hamburg, spreche ich für das stets hilfsbereite Interesse bei der Durchführung der Arbeit meinen herzlichsten Dank aus. Herrn Prof. Dr. K. HEYNS, Hamburg, und Herrn Prof. Dr. F. WEYGAND, Heidelberg, danke ich für wertvolle Ratschläge. Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur.

- BÖMEKE, H.: Arch. f. Mikrobiol. **10**, 385 (1939); **15**, 414 (1951). — BOLTJES, K.: Proefschrift. Delft 1934; Arch. f. Mikrobiol. **7**, 188 (1936). — BREED, R. S., E. G. D. MURRAY and A. P. HITCHENS: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore 1948. — CALVIN, M., A. A. BENSON u. Mitarb.: University of California, Radiation Laboratory. Contract No W 7405-eng 48. — DICKENS, F., and G. D. GREVILLE: Biochemic. J. **27**, 213 (1933). — ENGEL, H.: Die Methoden der Fermentforschung **4**, 2706 (1941). — ENGEL, H., u. W. MEVIUS, jr.: Ber. dtseh. bot. Ges. **64**, 208 (1951). — ENGEL, H., u. W. SKALLAU: Zbl. Bakter. II, **97**, 305 (1937). — ENLOWS, E.: Hyg. Lab. Bull. Washington **121**, 1920. — FARGHALY, A. H.: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **36**, 165 (1950). — GAFFRON, H.: ABDERHALDEN, Handbuch der biol. Arbeitsmethoden Abt. XI. Berlin, Wien 1929. — HENRICI, A. T., and D. E. JOHNSON: J. Bacter. **30**, 61 (1935). — HES, J. W.: Rec. Trav. bot. néerl. **34**, 233 (1937). — JAKOB, A.: Klin. Wschr. **24/25**, 882 (1947). — Med. Klin. **42**, 22 (1947) (a). — KAMEN, M. D.: Radioactive tracers in biology. N. Y. 1948. — LIPMAN, F., and L. C. TUTTLE: J. of Biol. Chem. **158**, 505 (1945). — MARKHAM, R., and J. D. SMITH: Biochemic. J. **45**, 294 (1949). — METZNER, P.: Jb. Bot. **49**, 325 (1920). — OCHOA, S.: J. of Biol. Chem. **159**, 243 (1945); **174**, 133 (1948). — RABINOWITSCH, E. I.: Photosynthesis and related Processes I. N. Y. 1945 (1948). — RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie. Berlin, Göttingen, 2. Aufl. 1952. — RULLMANN, W.: Zbl. Bakter. II, **4**, 152 (1898). — SCHLOSSBERGER, H., A. JAKOB u. G. PIEKARSKI: Naturwiss. **37**, 186 (1950). — SÖHNGEN, N. L.: Zbl. Bakter. II, **15**, 513 (1906). — STANIER, R. Y., and C. B. VAN NIEL: J. Bacter. **42**, 437 (1941). — STEPHENSON, M.: Bacterial Metabolism. London 1950. — STUTZER, A., u. R. HARTLEB: Zbl. Bakter. II, **3**, 6, 54, 161, 235, 311, 351 (1897); Mitt. d. landw. Inst. d. kgl. Univ. Breslau 1898. Ref. Zbl. Bakter. II, **5**, 678 (1899). — WARBURG, O., u. F. KUBOWITZ: Biochem. Z. **203**, 95 (1928). — WERKMAN, C. H., and H. G. WOOD: Advances in Enzymol. **2**, 135 (1942). — WEYGAND, F., A. WACKER u. H. DELLWEG: Z. Naturforschg **7b**, 156 (1952).

(Aus dem Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung, München.)

Hemmende und abtötende Wirkung von Konservierungsmitteln.

Von

M. VON SCHELHORN*.

(Eingegangen am 14. Februar 1953.)

Zweck der Verwendung von chemischen Konservierungsmitteln ist, zu verhindern, daß sich die in Lebensmitteln vorhandenen unerwünschten Mikroben vermehren und es dadurch zur Anreicherung ihrer Stoffwechselprodukte, in vielen Fällen auch zu makroskopisch sichtbaren Kolonien der Mikroben kommt, so daß infolgedessen die Lebensmittel unerwünschte Eigenschaften annehmen und verderben. Dieses Ziel kann auf zweierlei Weise erreicht werden. Entweder, indem die Mikroben durch die fraglichen Chemikalien lediglich in ihrer Vermehrung gehemmt oder, indem sie abgetötet werden. Im ersteren Falle spricht man von fungistatischer bzw. bakteriostatischer Wirkung, im letzteren von fungicider bzw. baktericider; RAHN faßt sie unter die Begriffe „antiseptics“, bzw. „disinfectants“.

Ziel der im folgenden beschriebenen eigenen Untersuchungen war, den Verlauf von Hemmung und Tod von Mikroorganismen unter der Wirkung von chemischen Konservierungsmitteln näher zu klären und festzustellen, ob und inwieweit den Konservierungsmitteln hemmende oder abtötende Wirkung zuzuschreiben ist. Die Untersuchungen erstreckten sich auf folgende Konservierungsmittel: Benzoesäure, Paraoxybenzoesäureester, Salicylsäure, Ameisensäure, Propionsäure und schweflige Säure.

Versuchsmethodik.

Wie in früheren Arbeiten der Verfasserin über die Wirksamkeit und den Wirkungsbereich von Konservierungsmitteln (v. SCHELHORN, 1951a u. b), wurden Lösungen von Malznährbrühe hergestellt, mit Zusätzen von Konservierungsmitteln versetzt und sodann mittels HCl auf einen bestimmten pH-Wert eingestellt.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden größtenteils bei pH 3 durchgeführt. Dies geschah aus folgenden Erwägungen heraus:

Von den meisten der in Frage kommenden Konservierungsmittel sind nur bei stark saurer Reaktion des Systems Substrat + Konservierungsmittel ausreichend hohe Anteile im undissoziierten, mikrobiologisch wirksamen (Literatur bei v. SCHELHORN, 1951b; vgl. auch A. RIPPEL-BALDES, S. 146) Zustand vorhanden, so daß gewisse Erscheinungen, so insbesondere kurzfristiges Absterben (S. 33ff.),

* Als technische Assistentin wirkte Frau G. PRÄG bei der Durchführung der Versuche mit.

hervorgerufen und studiert werden können. Durch die Lebenstätigkeit der Mikroben entsteht ferner während der Beobachtungsdauer vielfach Säure. Ist infolge nicht ausgesprochen saurer Reaktion bei Versuchsbeginn ein Teil des Konservierungsmittels im dissoziierten Zustand vorhanden, so kann das Verhältnis „dissoziiert zu undissoziiert“ durch die während der Versuchsdauer neu entstehende Säure zugunsten des undissoziierten Anteils verschoben werden. Dadurch können ganz andere Wirksamkeitsverhältnisse entstehen, als bei Versuchsbeginn beabsichtigt waren, und durch die Inkontinuität der Versuchsbedingungen kann die Auswertung der Versuche wesentlich erschwert werden. Dagegen sind bei einem Anfangs-pH-Wert von pH 3 die fraglichen Konservierungsmittel sowieso schon größtenteils undissoziiert (z. B. Benzoesäure bei pH 3 zu 94%), so daß sich ein weiteres Ansteigen der Säure nicht mehr stark in Erhöhung des undissoziierten Anteils bemerkbar machen kann. Säurebildung während der Versuchsdauer, wie sie durch die Lebenstätigkeit gewisser Mikroorganismen hervorgerufen werden könnte, wird in diesem Falle das Versuchsergebnis nicht mehr wesentlich beeinflussen.

Nach der üblichen Sterilisation wurden die mit den Konservierungsmitteln versehenen Versuchslösungen auf eine bestimmte, in der Versuchsanordnung vorgesehene Temperatur gebracht, mit Testmikroben beimpft und der vorgesehenen Lagerzeit auf einer bestimmten Temperatur gehalten. Proben mit leichtflüchtigen Konservierungsmitteln, z. B. mit Propionsäure oder schwefliger Säure, wurden nur in zugeschmolzenen Röhrchen gelagert.

Nachdem die Testmikroben (mittels des LINDNERSchen Tröpfchenverfahrens hergestellte Einzellkulturen) die vorgesehene Zeit in der mit Konservierungsmitteln versehenen Lösung verblieben waren, wurden sie der Wirkung der Konservierungsmittel wieder entzogen und die Zahl der Überlebenden durch Herstellen von Sekundärkulturen auf Agar festgestellt. Aus der ursprünglichen, mit Konservierungsmittel versehenen Lösung wurde je 1 cm³ entnommen und, nötigenfalls unter Einschaltung der bekannten Verdünnungsstufen zur Ermöglichung der Zählung, mit 9 cm geschmolzenem Malzagar versetzt und auf Platten ausgegossen. Der Agar für die Sekundärkulturen hatte einen pH-Wert von 6,5. Durch Einstellung solcher annähernd neutraler Reaktion für die Sekundärkulturen gelang es, die aus der ursprünglichen Lösung mitgeschleppten Reste von Konservierungsmitteln, wenigstens, soweit es solche vom Salz-Säure-Charakter betraf, unschädlich zu machen. Die Einschaltung von Verdünnungsstufen mußte weiterhin die mit den Mikroben notwendigerweise aus der Originallösung mitgeschleppten Konservierungsmittelreste relativ verkleinern. So konnte durch beide Maßnahmen, Heraufsetzen des pH-Wertes und Verdünnen, erreicht werden, daß im Medium der Sekundärkulturen tatsächlich nur kleinste Anteile von Konservierungsmitteln wirksam waren, die keine merkliche Vermehrungshemmung verursachen konnten.

Die Sekundärkulturen wurden 5 Tage bei 20° bebrütet. Auf eine tödliche Wirkung des vorangegangenen Aufenthaltes in der mit Konservierungsmittel versetzten Lösung wurde dann geschlossen, wenn in der Sekundärkultur auf Agar kein Wachstum mehr erfolgte.

Freilich könnte eingewendet werden: Die Möglichkeit ist nicht ganz von der Hand zu weisen, daß die Mikroben im Augenblick des Verbringens in die Sekundärkultur noch nicht abgestorben, sondern nur gehemmt waren und daß ihre Vermehrung, die zur Zählung auf Agarplatten der Sekundärkultur hätte führen können, lediglich deshalb unterblieb, weil sie aus der mit Konservierungsmittel versetzten Lösung doch noch Konservierungsmittelreste, entweder in ihrem Inneren oder an ihrer Oberfläche adsorbiert, mit sich brachten. Auf verschiedene Weise wurde versucht, die Mikroben von solchen etwa noch anhaftenden Konservierungsmittelresten zu befreien oder sie trotz derselben noch zur Vermehrung zu bringen. So

wurde eine Reihe von Sekundärkulturen über eine Woche bebrütet; jedoch war der Anteil an Überlebenden dabei nicht höher als bei kürzerer Bebrütung. Versuchsweise wurden solche als tot angesehene Mikroben vor Einbringen in die Sekundärkultur einer 6stündigen Passage in Malzlösung von pH 6,5 unterzogen und erst dann in den Agar gebracht. Auch hierbei ergab sich jedoch das gleiche Bild wie bei der Einbringung sofort nach Entnahme aus der Konservierungsmittellösung in den Agar der Sekundärkultur. Ähnlich, wie bei FLETT u. Mitarb. hinsichtlich der Wirkung von Phenol wurde versucht, durch Ausschütteln mit Aktivkohle etwa adsorbierte Benzoesäurereste von den Mikroben auf folgende Weise wieder zu entfernen: Nach Abschluß der vorgesehenen Verweilzeit in der mit Benzoesäure versehenen Lösung wurde das Versuchsobjekt (*Willia anomala*) 10 min lang mit dest. Wasser, dem auf 10 cm^3 je 1 g Aktivkohle (Knochenkohle bzw. Clarocarbon C. Merck) zugesetzt war, ausgeschüttelt und erst dann auf Agarplatten angesetzt. Es zeigte sich im Prozentsatz der Überlebenden jedoch kein deutlicher Unterschied gegenüber entsprechenden, nicht mit Aktivkohle behandelten Versuchen.

Alle diese Versuche beweisen freilich noch nicht hundertprozentig, daß die als „tot“ angesehenen Mikroben wirklich zum Zeitpunkt, für den dies angenommen wurde, bereits vollständig abgestorben waren. Eine gewisse Unsicherheit in dieser Beziehung haftet aber auch allen Versuchen über die Wirkung anderer Zellgifte, tödlicher Strahlen bzw. über die Wirkung hoher Temperaturen an. So dürfte es vielleicht doch erlaubt sein, obwohl im Bewußtsein, daß spätere Untersuchungen weitere Erkenntnisse bringen können, das „Absterben“ unter der Wirkung von Konservierungsmitteln ebenso mathematisch zu verfolgen, wie dies in inzwischen klassisch gewordenen Untersuchungen über die Wirkung der oben genannten anderen Agentien geschehen ist.

Als Testmikroben dienten die Hefen *Willia* (= *Hansenula*) *anomala* und *Saccharomyces cerevisiae*. Trotz gewisser Nachteile, z. B. der Agglomeration, die alle Zählungen mittels des Plattengußverfahrens ungenau macht, sind Hefen noch die bestgeeigneten Testmikroben für diese Versuche, da sie ohne Nachteile bei pH 3 und ebenso bei höheren pH -Werten kultiviert werden können. Auch eine Reihe von Versuchen mit *Penicillium glaucum* und *Aspergillus niger* wurde durchgeführt. Sie erbrachten dasselbe Bild wie die hier behandelten Versuche mit Hefen; es wurde z. B. kurzfristige Abtötung, allerdings durch etwas stärkere Dosierung, festgestellt.

Die Beeimpfung der verschiedenen Versuche erfolgte in der Weise, daß mittels Pipetten aus einer gut geschüttelten Aufschwemmung der Mikroben den mit Konservierungsmitteln versetzten Lösungen bestimmte Volummengen zugesetzt wurden. Gleichzeitig wurden jeweils Kontrollplatten zur Feststellung der Zahl der mit 1 cm^3 der betreffenden Mikrobenaufschwemmung zugegebenen lebenden Zellen gegossen. Natürlich ist es bei diesem Verfahren nicht möglich, in alle Proben 100%ig die gleiche Individuenzahl zu bringen, und gewisse Ungenauigkeiten in den Ergebnissen sind darauf zurückzuführen; jedoch erschien dieses Verfahren von den in Frage kommenden noch als das genaueste.

Soweit Versuche über Wirkung von Konservierungsmitteln in Verbindung mit Hitzesterilisation durchgeführt wurden (S. 37 ff.), erfolgte die Erhitzung von jeweils 1 cm^3 in Glasröhrchen von 6,5 cm Länge und 0,8 cm Durchmesser, Einbringen in ein Wasserbad von der gewünschten Temperatur und Kühlung nach Abschluß der Erhitzungszeit in Eiswasser. Mittels eines Thermoelements wurde festgestellt, daß die gefüllten Röhrchen rund 1 min benötigten, um von 20° C auf annähernd 50° C (Versuchstemperatur) zu kommen, und daß das Abkühlen von 50° auf 20° ebenfalls 1 min erforderte. Alle Röhrchen einer Versuchsserie wurden gleichzeitig in das Wasserbad getaucht und wieder daraus entfernt, so daß auch die Anwärmzeiten bei allen die gleichen sein mußten.

Versuchsergebnisse.*Kurzfristiges Absterben von Mikroorganismen unter der Wirkung hoher Konzentrationen von Konservierungsmitteln.*

Von kurzfristigem Absterben wird im folgenden dann gesprochen, wenn sämtliche im Versuch vorhandenen Mikroorganismen innerhalb 10 min abstarben. Um derartig rasches Absterben zu erreichen, sind von den Konservierungsmitteln (zu unterscheiden von den schon in kleineren Mengen rasch abtötenden Desinfektionsmitteln) recht erhebliche Mengen notwendig. Tab. 1 zeigt, welche Konzentrationen verschiedener Konservierungsmittel ein Absterben der eingebrachten Testmikroben zu mindestens 99,99% innerhalb 10 min hervorriefen.

Tabelle 1. *Konservierungsmittelzusätze, die in Malznährbrühe von pH 3 bei 20° C innerhalb 10 min Absterben der vorhandenen Zellen von Willia anomala zu 99,99% bewirkten.*

Name des Konservierungsmittels	Zusatz in g Na-Salz je 100 cm ³	daraus bei pH 3 resultierender Zusatz in Mol undissoziierter Säure ¹ je 100 cm ³
Salicylsäure	0,1	0,00031
Benzoesäure	0,4	0,0026
Ameisensäure	2	0,024
schweflige Säure	0,2	0,00009 H ₂ SO ₃ + 0,0015 HSO ₃ '

Bei Propionsäure konnte bei Zusätzen bis zu 8% Na-Propionat entsprechend 0,082 Mol/100 cm³ undissoziierter Propionsäure Abtötung von *Willia anomala* zu 99,99% innerhalb 10 min nicht erreicht werden, ebenso war eine derartig kurzfristige Abtötung von *Willia anomala* durch Paraoxybenzoesäureäthylester nicht möglich, da die Löslichkeit zur Erzielung entsprechender Konzentrationen nicht ausreichte.

Bei höheren pH-Werten, insbesondere bei schwach saurer bis neutraler Reaktion konnte auch durch die in Tab. 2 genannten Konservierungsmittel Abtötung von *Willia anomala* zu 99,99% innerhalb 10 min nicht, bzw. nur unter Anwendung von Zusätzen von mehreren Prozent und darüber, erreicht werden. Für die rasche Abtötung von Mikroorganismen durch Konservierungsmittel sind offenbar ebenso wie für die länger dauernde bei den Konservierungsmitteln vom Salz-Säure-Charakter nur die undissoziierten Moleküle verantwortlich.

Zeitlicher Verlauf des kurzfristigen Absterbens; Beziehungen zwischen Konservierungsmittel-Konzentration und zeitlichem Verlauf des Absterbens.

Die Zeit von 10 min, die etwas willkürlich als Begrenzung für den Begriff „kurzfristige Abtötung“ gewählt wurde, wurde in weiteren Versuchen noch unterteilt. Tab. 2 zeigt einen diesbezüglichen Versuch

¹ Angaben über Höhe der undissoziierten Anteile in Abhängigkeit vom pH-Wert: M. V. SCHELHORN (1950a u. b).

mit *Willia anomala* bei 20° C in Malzlösung von pH 3, unter der Wirkung von Benzoessäure, Ameisensäure und Salicylsäure.

Tabelle 2. Absterben von *Willia anomala* in Malzlösung von pH 3 mit verschiedenen Zusätzen bei 20° C.

Einwaage g Na-Salz in 100 cm ³	Daraus bei p _H 3 folgende Konzentration an undissoziiert- ter Säure in Mol je 100 cm ³	Überlebende nach Minuten							
		1	2	3	4	6	8	10	
Benzoessäure									
0,3	0,0019	3 × 10 ⁵	2 × 10 ⁵	2 × 10 ⁵	2 × 10 ⁵	3 × 10 ⁴	9 × 10 ³	1 × 10 ³	
0,4	0,0026	3 × 10 ⁴	7 × 10 ³	5 × 10 ²	2 × 10 ²	< 10*			
Ameisensäure									
1	0,012	2 × 10 ⁵	3 × 10 ⁴	1 × 10 ⁴	8 × 10 ³	1,7 × 10 ²	60	40	
2	0,024	4,5 × 10 ⁴	4 × 10 ³	1,7 × 10 ²	< 10				
Salicylsäure									
0,05	0,00015	4 × 10 ⁴	2 × 10 ⁴	9 × 10 ³	1,4 × 10 ³	4 × 10 ²	< 10		
0,075	0,00023	1 × 10 ⁴	2 × 10 ²	50	< 10				
0,1	0,00031	1 × 10 ³	40	10	< 10				

Einsaat bei Benzoessäure und Ameisensäure 5 × 10⁵, bei Salicylsäure 3,4 × 10⁵ Zellen in 100 cm³.

* Die Angabe „< 10“ bzw. „< 100“ in dieser und den folgenden Tabellen entspricht der Versuchsanordnung (vgl. S. 31), bei welcher vor Einbringung in die Sekundärkulturen noch die betreffende Verdünnungsstufe eingeschaltet wurde.

Noch nicht ganz geklärt ist der zeitliche Verlauf des kurzfristigen Absterbens unter der Wirkung der schwefligen Säure, da die Durchführung von exakten Versuchen, entsprechend denjenigen, die der Tab. 2 zugrunde liegen, wegen der starken Flüchtigkeit der mikrobiologisch wirksamen Komponente besonders schwierig ist.

Von besonderem Interesse ist der Anteil der Absterbenden in der Zeiteinheit und der Verlauf der Absterbekurven. Zu ihrer Beurteilung wurde die Absterbegeschwindigkeitskonstante K (deathrate constant der amerikanischen Autoren) eingeführt. Für den zeitlichen Verlauf des Absterbens einzelliger Mikroorganismen unter der Wirkung von Giften, z. B. Desinfektionsmitteln, gilt die Beziehung für monomolekulare Reaktionen:

$$K = \frac{1}{t} \times \log \frac{\text{Zahl der Lebenden bei Beginn der Einwirkung}}{\text{Zahl der Überlebenden nach der Zeit } t}$$

(vgl. RAHN, S. 29 ff.).

Es war zu prüfen, ob diese Gleichung auch für das kurzfristige bzw. längerfristige Absterben von Mikroorganismen unter der Einwirkung von Konservierungsmitteln zutrifft. Tatsächlich blieb (vgl. Tab. 3) in den Versuchen der Tab. 2 der Wert K jeweils bei ein und derselben Konzentration eines bestimmten Konservierungsmittels — von gewissen, durch

die Ungenauigkeit der Methodik bedingten Abweichungen abgesehen — während der ganzen jeweiligen Versuchsdauer offenbar konstant.

Die Gleichung $K = \frac{1}{t} \times \log \frac{Z_0}{Z_t}$ ergibt graphisch dargestellt auf semilogarithmischem Papier, wenn auf der Abszisse die Zeiteinheiten, auf der Ordinate die Zahl der Überlebenden eingetragen werden, eine Gerade. In den vorliegenden Versuchen wird allerdings das Bild der Geraden nur annähernd erreicht, weshalb auf eine graphische Darstellung verzichtet werden soll.

Tabelle 3. Werte für die Geschwindigkeitskonstante K des Absterbens von *Willia anomala* durch verschiedene Zusätze in Malzlösung bei 20° C.

Einwaage g Na-Salz in 100 cm ³	Daraus bei pH 3 folgende Konzentration an undissoziiert- er Säure in Mol je 100 cm ³	K experimentell bestimmt im Zeitraum Minuten						
		1	2	3	4	6	8	10
Benzoessäure								
0,3	0,0019	0,22	0,20	0,13	0,10	0,20	0,22	0,27
0,4	0,0026	1,2	0,9	1,0	0,9			
Ameisensäure								
1	0,012	0,40	0,61	0,57	0,45	0,58	0,49	0,41
2	0,024	1,00	1,05	1,15				
Salicylsäure								
0,05	0,00015	0,93	0,62	0,52	0,60	0,49		
0,075	0,00023	1,5	1,6					
0,1	0,00031	2,5	2,0					

Ebenso muß vorerst darauf verzichtet werden, näher auf die Beziehungen zwischen der Konzentration an Konservierungsmittel und der Neigung dieser Geraden einzugehen, da hierüber noch nicht genug gesicherte Werte gewonnen werden konnten. RAHN (S. 67) gibt die Gleichung an:

$$K t c^n = \log \frac{Z_0}{Z_t},$$

wobei c dabei die Konzentration des Zellgiftes, n einen Wert, der für die verschiedenen Zellgifte und die verschiedenen Mikroorganismenarten spezifisch ist, bedeutet. Es scheint aber, daß n nicht in allen Konzentrationsbereichen konstant bleibt und von zahlreichen Nebenumständen beeinflusst wird. Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Wertes n für die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Zellgiften scheinen nicht nur bei mir, sondern auch bei anderen Autoren aufgetreten zu sein. Jedenfalls erwähnt RAHN (S. 71ff.) die Tatsache wiederholt und warnt davor, auf Bestimmungen von n irgendwelche Theorien aufzubauen.

So müssen wir uns vorerst mit der allgemeinen Erkenntnis begnügen, daß mit steigender Konzentration der Konservierungsmittel das Absterben der Mikroben immer rascher erfolgt.

Voraussetzung für die Erzielung des vorbeschriebenen Verlaufs der Absterbekurven bei kurzfristiger Abtötung ist, daß genetisch einheitliches Material vorliegt. Bei Versuchen, die nicht mit einem von einer

Zelle abstammenden Stamm, sondern mit Populationen von *Willia anomala* oder *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt wurden, starben auch bei kurzfristiger Abtötung in der ersten Zeiteinheit der Versuche mehr Individuen ab als in späteren Zeiteinheiten. Noch weniger ist der Absterbeverlauf natürlich durch die genannte Beziehung erfaßbar, wenn ein Gemisch mehrerer Arten vorhanden ist. Auf die Bedeutung der Agglomeration von Hefen als Fehlerquelle wurde bereits hingewiesen (S. 32). Dadurch, daß sich bei fortgesetztem Schütteln, wie es bei wiederholter Entnahme im Rahmen dieser Versuche notwendig ist, Zellagglomerate lösen, kann natürlich das Bild einer Verlangsamung des Absterbens unter Umständen vorgetäuscht werden.

*Beziehungen zwischen Temperatur und dem zeitlichen Verlauf
des kurzfristigen Absterbens.*

Die bisher beschriebenen Versuche wurden durchweg bei 20° C durchgeführt. Tab. 4 bringt Versuche, bei welchen die Temperatur variiert wurde. Aus ihr wird ohne weiteres deutlich, daß mit steigender Temperatur das kurzfristige Absterben unter der Wirkung ein und derselben Konservierungsmittel-Konzentration rascher erfolgt. Soweit Angaben hierüber vorhanden sind, scheint sich die Dissoziation der Benzoesäure und Salicylsäure innerhalb des Temperaturbereiches 10—40° C nicht nennenswert zu ändern, so daß diese Erklärungsmöglichkeit entfällt.

Tabelle 4. Absterben von *Willia anomala* in Lösungen von verschiedener Temperatur und verschiedenen Zusätzen während 10 min langer Einwirkung.

Einwaage g Na-Salz in 100 cm ³	Daraus bei p _H 3 folgende Konzentration an undissoziierter Säure in Mol je 100 cm ³	Zahl der Überlebenden nach Aufenthalt von 10 min in der mit Konservierungsmittel versetzten Lösung bei ° C			
		10	20	30	40
Benzoesäure					
0,1	0,00065	5 × 10 ⁵	5 × 10 ⁵	5 × 10 ⁵	1 × 10 ⁵
0,2	0,0013	2 × 10 ⁵	2 × 10 ⁵	5 × 10 ⁴	30
0,3	0,0019	1 × 10 ⁵	1 × 10 ³	< 10 ²	< 10 ²
0,4	0,0026	2 × 10 ³	< 10 ²	< 10 ²	
Salicylsäure					
0,04	0,00012	2 × 10 ⁵	2 × 10 ⁵	9 × 10 ³	< 10 ²
0,1	0,00031	2 × 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	

Einsaat bei Benzoesäure 5 × 10⁵, bei Salicylsäure 2 × 10⁶ Zellen im cm³.

Die genauere Analyse der Temperaturabhängigkeit der Wirksamkeit der einzelnen Konservierungsmittel steht noch aus.

Bei den Versuchen der Tab. 4 handelt es sich um verhältnismäßig niedrige, an sich für die betreffenden Mikroorganismen, wenn überhaupt, nur in Zeiträumen von Tagen tödliche Temperaturen und um hohe

Konservierungsmittelzusätze. In der Praxis der Anwendung von Konservierungsmitteln dürften derartige Verhältnisse keine große Rolle spielen. Größeres praktisches Interesse verdient die Frage, ob bei Dosierungen von Konservierungsmitteln, wie sie praktisch zugelassen und üblich sind, die Wirkung der üblichen Hitzesterilisation gesteigert werden kann. Es seien daher einige orientierende Versuche hierüber mitgeteilt. Vorerst wurde dabei lediglich untersucht, wie sich eine gleichlange und gleichhohe Erhitzung mit und ohne Zusatz von Konservierungsmitteln auswirkte. Die Aufstellung von Hitzeabtötungskurven mit und ohne Zusatz von Konservierungsmitteln für verschiedene Mikroorganismen wird späteren Arbeiten vorbehalten.

Tab. 5 bringt Ergebnisse diesbezüglicher Versuche. Um Ungenauigkeiten, die sich durch den Temperaturgang beim Anwärmen und Abkühlen der Proben, das jeweils etwa 1 min in Anspruch nahm, ergaben, möglichst gering zu halten, wurden Erhitzungszeiten von einer Stunde gewählt. Infolge der geringen Hitzeresistenz der Testmikroben durfte dabei die Temperatur, auf die erhitzt wurde, nur 50° C betragen.

Tabelle 5. Zahl der lebenden Zellen von *Willia anomala* je cm^3 vor und nach einem Erhitzen von 1 Std auf 50° C in Malznährbrühe von pH 4,5 mit Zusätzen verschiedener Konzentration.

Einwaage g Na-Salz in 100 cm ³	Daraus bei p _H 4,5 folgende Konzentration an undissoziierter Säure in Mol je 100 cm ³	Lebende Zellen/cm ³	
		Vor dem Erhitzen (Z ₀)	nach dem Erhitzen (Z _t)
Benzoessäure			
0	—	6 × 10 ⁵	7 × 10 ⁴
0,01	0,000023	6 × 10 ⁵	7 × 10 ⁴
0,025	0,000057	6 × 10 ⁵	2 × 10 ⁴
0,05	0,00011	6 × 10 ⁵	3 × 10 ³
0,1	0,00023	6 × 10 ⁵	90
Schweflige Säure			
0	—	3 × 10 ⁵	4 × 10 ⁴
0,005	nicht	3 × 10 ⁵	90
0,01	bestimmbar	3 × 10 ⁵	20
0,1	—	3 × 10 ⁵	<10

Über die Dissoziation der schwefligen Säure bei verschiedenen Temperaturen konnten nur unvollständige Angaben beschafft werden, weshalb auf Berechnung der Anteile an H_2SO_3 und HSO_3' verzichtet werden soll. Bei 50° ist die Dissoziationskonstante der ersten Dissoziationsstufe wesentlich niedriger als bei 18 bzw. 25°. Daraus läßt sich auf eine Vergrößerung des undissoziierten Anteils bei gleichen pH -Werten bei 50° und damit auf eine verstärkte mikrobiologische Wirksamkeit schließen.

Beziehungen zwischen kurzfristiger Abtötung durch Konservierungsmittel und der Zusammensetzung des Substrates.

Selbstverständlich sollten hier alle Fälle, in welchen das Konservierungsmittel durch das Substrat oder durch Stoffwechselprodukte der Mikroorganismen in seiner Wirksamkeit beeinflußt wird, von der Betrachtung ausgeschlossen sein, weshalb die Vergleichsnährlösungen so gewählt wurden, daß ein Reagieren mit Benzoesäure unwahrscheinlich erschien. Tab. 6 zeigt einen Versuch über die Wirkung gleicher Konservierungsmittelmengen auf *Willia anomala* in verschiedenen Nährmedien.

Tabelle 6. Überlebende Hefen nach 10 min langer Einwirkung verschiedener Zusätze von Na-Benzoeat bei 20°C und p_H 3 in verschiedenen Medien. Einsaat 1×10^5 Zellen/cm³.

Zusatz g Na-Benzoeat in 100 cm ³	Daraus folgende Konzentration an undissoziierter Benzoesäure in Mol je 100 cm ³	Überlebende in			
		Destilliertem Wasser	Nährlösung	Nährlösung	
				+ 6% NaCl	+ 12% NaCl
0,1	0,00065	8×10^4	1×10^5	1×10^5	<10
0,2	0,0013	6×10^4	8×10^4	<10	<10
0,4	0,0026	<10	<10	<10	<10

Ungünstiges Nährmedium, z. B. Nahrungsmangel (dest. Wasser) oder hoher NaCl-Gehalt schwächen offenbar die Widerstandskraft der Zellen gegenüber hohen Konservierungsmittel-Konzentrationen. Es muß dabei beachtet werden, daß eine Konzentration von 12 Gewichtsprozenten NaCl an sich noch keineswegs tödlich für *Willia anomala* ist, daß vielmehr dabei ohne Konservierungsmittel noch Vermehrung von *Willia anomala* stattfindet. Es handelt sich in unserem Falle offenbar um eine Kombination der Wirkung der Benzoesäure und der hohen NaCl-Konzentration.

Wie verschiedene Versuche zeigten, gehört *Willia anomala* zu denjenigen Mikroorganismen, die hohe Salzkonzentrationen ertragen. Bei salzempfindlicheren Mikroben kann die Verstärkung der Wirksamkeit der Benzoesäure schon bei niedrigeren Salzkonzentrationen eintreten.

Langfristiges Absterben unter der Wirkung niedrigerer Konservierungsmittelzusätze.

Zeitlicher Verlauf des langfristigen Absterbens.

Die Tab. 7—9 zeigen Versuche, bei denen die Wirkung verhältnismäßig niedriger Konzentrationen von Konservierungsmitteln (Tab. 7 Benzoesäure, Tab. 8 Salicylsäure, Tab. 9 Propionsäure) über eine Reihe von Tagen verfolgt wurde. Die Versuche wurden wiederum bei 20°C durchgeführt, die sonstige Versuchsanordnung war die gleiche wie bei den Versuchen mit kurzfristiger Abtötung. Aus ihnen ist ersichtlich: Bei gewissen niedrigen Konzentrationen von Konservierungsmitteln

Tabelle 7. Absterben von *Willia anomala* im Verlauf von Tagen unter der Einwirkung niedriger Dosen von Benzoesäure. Einsaat 2×10^5 Zellen/cm³.

Einwaage g Na-Benzolat in 100 cm ³	Daraus bei pH 3 folgende Konzentration an undissoziierter Benzoesäure in Mol je 100 cm ³	Überlebende nach Tagen					
		1	2	5	7	10	20
0,003	0,000019	$1,5 \times 10^6$	1×10^7	Kahmd.			
0,005	0,000033	3×10^5	$4,5 \times 10^6$	„			
0,007	0,000046	7×10^4	8×10^5	„			
0,01	0,000065	7×10^4	7×10^4	$1,6 \times 10^6$	3×10^6	Kahmd.	Kahmd.
0,015	0,000098	$6,4 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	4×10^2	6×10^2	2×10^4	„
0,02	0,00013	4×10^4	4×10^3	<10			
0,03	0,00019	2×10^4	6×10^2	<10			
0,05	0,00033	9×10^3	1×10^2	<10			
0,07	0,00046	$1,2 \times 10^3$	<10				
0,1	0,00065	<10					

Tabelle 8. Absterben von *Willia anomala* im Verlauf von Tagen unter der Einwirkung niedriger Dosen von Salicylsäure. Einsaat 3×10^5 Zellen/cm³.

Einwaage g Na-Salicylat in 100 cm ³	Daraus bei pH 3 folgende Konzentration an undissoziierter Salicylsäure in Mol je 100 cm ³	Überlebende nach Tagen				
		1	3	4	8	20
0,003	0,000009	1×10^6	7×10^6	Kahmd.		
0,004	0,000012	3×10^5	$5,5 \times 10^6$	„		
0,006	0,000018	$2,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^6$	1×10^7	Kahmd.	
0,008	0,000025	4×10^3	2×10^3	4×10^6	„	
0,01	0,000031	6×10^2	9×10^3	$1,3 \times 10^6$	nicht festgest.	Kahmd.
0,0125	0,000038	1×10^2	1×10^3	5×10^3	„	„
0,0150	0,000046	<10	1×10^2	4×10^3	„	„
0,02	0,000061	<10	<10	<10	„	<10

Tabelle 9. Absterben von *Willia anomala* im Verlauf von Tagen unter der Einwirkung niedriger Dosen von Propionsäure. Einsaat 7×10^5 Zellen/cm³.

Einwaage g Na-Propionat in 100 cm ³	Daraus bei pH 3 folgende Konzentration an undissoziierter Propionsäure in Mol je 100 cm ³	Überlebende nach Tagen				
		1	4	7	11	20
0,4	0,004	7×10^5	3×10^4	8×10^4	5×10^5	Kahmd.
0,7	0,007	3×10^5	3×10^3	3×10^3	<10	
1	0,01	8×10^4	<10			
1,5	0,015	5×10^3	<10			
2	0,02	<10				

findet ebenfalls Absterben aller vorhandenen Mikroorganismen statt, teilweise innerhalb längerer Zeiträume bis zu Tagen. Werden dagegen die Konservierungsmittel-Konzentrationen noch niedriger, so kommt es zwar zunächst zum Absterben eines mehr oder weniger großen Teiles der vorhandenen Mikroorganismen, der Rest nimmt aber offenbar die Vermehrungstätigkeit nach einiger Zeit wieder auf und es kommt verspätet doch noch zu den Erscheinungen des mikrobiologischen Verderbs. Bei zahlreichen Wiederholungen solcher Versuche wurde sehr häufig ein derartiges Verhalten — zunächst Absterben eines großen Teiles der vorhandenen Mikrobenzellen, sodann wieder Zunahme — eindeutig festgestellt. Geprüft wurde in dieser Hinsicht das Verhalten von *Willia anomala* und *Saccharomyces cerevisiae*. Die Beobachtungen wurden in gleichem Sinne bei Benzoesäure, Salicylsäure, Ameisensäure und Propionsäure gemacht.

Hier kann von einer Konstanz der Konstanten der Absterbegeschwindigkeit K natürlich nicht mehr die Rede sein.

Noch nicht ganz geklärt sind die Verhältnisse bei der schwefligen Säure, die wegen ihrer besonders starken Flüchtigkeit und infolge des Umstandes, daß sie durch Aldehyde, die beim Stoffwechsel der Mikroorganismen entstehen, teilweise abgebunden wird, besondere methodische Schwierigkeiten zu bieten scheint. Es sieht so aus, als ob hier die Grenze zwischen Zu- und Abnahme der Mikroorganismen scharf ausgeprägt ist und deshalb Übergänge mit schwankendem Verhalten, wie sie in den Tab. 7—9 in Erscheinung treten, fehlen.

Beziehungen zwischen Lagertemperatur und zeitlichem Verlauf des langfristigen Absterbens.

Während das kurzfristige Absterben unter der Einwirkung hoher Konservierungsmittelkonzentrationen ganz allgemein durch eine Steigerung der Temperatur beschleunigt, durch eine Senkung der Temperatur verzögert wird, sind die Beziehungen zwischen langfristigem Absterben in Gegenwart geringerer Konservierungsmittelkonzentrationen und der Lagertemperatur nicht so einfach zu formulieren.

Zu hohe, das Optimum überschreitende Temperaturen führten auch hier zu rascherem Absterben. Dasselbe war aber auch bei Kühlagerung der Fall. Versuche mit *Willia anomala* in Malzlösung von p_H 3 ergaben, daß bei Lagerung bei 20° C noch Benzoatzusätze von 0,01 und 0,015 g/100 cm³ den Verderb nicht aufhalten konnten, während die gleichen Zusätze bei gleichzeitiger Impfung und gleichem Impfmateriel und sonst vollständig gleichen Versuchsbedingungen, jedoch einer Lagerung bei 5° C im Verlaufe einiger Wochen zur Abnahme der Zellenzahl und schließlich zur vollständigen Sterilität der Lösung führten. Kühlagerung kann daher in geeigneten Fällen ebenfalls mit Anwendung chemischer Konservierungsmittel kombiniert werden.

*Beziehungen zwischen Zusammensetzung der Nährlösung
und dem zeitlichen Verlauf des langfristigen Absterbens.*

Tab. 10 zeigt einen Versuch mit *Willia anomala* in verschiedenen Nährmedien bei Einwirkung niedriger Konzentrationen von Benzoesäure. Als Vergleich dient die Zahl der Überlebenden (ausgedrückt in Prozent

Tabelle 10.

Überlebende von Willia anomala in Prozent der Einsaat nach 4tägigem Aufenthalt in verschiedenen Substraten mit verschieden hohen Zusätzen von Benzoesäure.

Einwaage g Na- Benzoat in 100 cm ³	Daraus bei pH 3 folgende Konzentration an undissoziiert- ter Benzoesäure in Mol je 100 cm ³	Überlebende in Prozent der Einsaat in den Nährlösungen				
		Destilliertes Wasser	ohne NaCl	Synthetische Nährlösung		
				mit 6% NaCl	mit 8% NaCl	mit 10% NaCl
0,01	0,000065	30	100	30	10	0,01
0,002	0,00013	0,1	100	10	1	0
0,04	0,00026	0,01	60	10	0,5	0

der Einsaat) nach 4tägiger Lagerung bei 20°. Ebenso wie das kurzfristige Absterben wird offenbar auch das langfristige Absterben unter der Wirkung von Konservierungsmitteln durch Nährstoffmangel und durch hohe Kochsalzzusätze beschleunigt.

Übergang von der kurzfristigen zur langfristigen Abtötung.

Die Definitionen „kurzfristiges“ und „langfristiges“ Absterben wurden selbstverständlich nur zur besseren Verständlichmachung geprägt und aus demselben Grund wurden bisher Beispiele mit extrem kurzer oder extrem langer Einwirkungszeit und entsprechend hoher oder niedriger Konzentration der Konservierungsmittel angeführt. Tatsächlich sind alle Übergänge hinsichtlich der Konzentration der Konservierungsmittel möglich und daraus folgende Zeiten für das Absterben der Mikroorganismen von Minuten bis zu Stunden und Tagen. Dabei gilt die Gleichung $K = \frac{1}{t} \times \log \frac{Z_0}{Z_t}$ um so besser, je kürzer die Abtötungszeiten, je höher die Konzentrationen der mikrobiologisch wirksamen Substanz sind, während bei einer Verlängerung der Absterbezeiten bzw. einer Verminderung der Konservierungsmittel-Konzentration die Konstante K die Tendenz annimmt, mit fortschreitender Zeit kleiner zu werden, ja das Absterben unter Umständen in erneute Vermehrung übergeht (Tab. 7—9).

Verhalten der Mikroorganismen bei Konservierungsmittel-Konzentrationen, die zur Abtötung nicht ausreichen.

Ein Teil dieses Abschnittes wurde bereits durch die Tab. 7—9 vorweggenommen. Bei nicht ausreichender Konservierungsmittel-Konzentration kommt es zur Vermehrung und zu den Erscheinungen des mikrobiologischen Verderbs. Die Vermehrung ist dabei gegenüber derjenigen bei

Abwesenheit von Konservierungsmitteln verzögert. Die aus den Tab. 7 bis 9 ersichtliche Erscheinung, daß zunächst ein Teil der vorhandenen Mikroben abstirbt, bevor der Rest wieder die Vermehrung aufnimmt, wurde bei ganz niedrigen Konservierungsmittel-Konzentrationen nicht nachgewiesen. Tab. 11 bringt nochmals einen Vergleich zwischen Vermehrung ohne Konservierungsmittelzusatz und bei Anwesenheit geringster Konzentrationen eines Konservierungsmittels.

Tabelle 11. Vermehrung von *Willia anomala* in Malznährbrühe von p_H 3 bei $20^\circ C$ ohne Konservierungsmittelzusatz und bei Gegenwart kleinster Mengen von Benzoesäure. Einsaat $3,2 \times 10^5$ Zellen/cm³.

Einwaage g Na- Benzoat in 100 cm ³	Daraus bei p_H 3 folgende Konzentration an undissoziiert- er Benzoesäure in Mol je 100cm ³	Zahl der Mikroben nach Tagen				
		1	2	3	4	7
0		$1,5 \times 10^6$	2×10^7	Kahmd.		
0,002	0,00013	8×10^5	6×10^6	$2,3 \times 10^7$	Kahmd.	
0,004	0,00026	$3,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	1×10^7	$1,7 \times 10^7$	Kahmd.
0,006	0,00039	$1,5 \times 10^5$	4×10^5	$1,6 \times 10^7$	8×10^6	„

Besprechung der Ergebnisse.

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen dürfte die Feststellung sein, daß offenbar jedes über kürzere oder längere Zeiträume hindurch beobachtete System Substrat + Mikroben + Konservierungsmittel entweder dem Endziel der Vermehrung der Mikroben oder dem Endziel des Absterbens sämtlicher vorhandener Mikroben bis zur Sterilität zustrebt. Dagegen konnte ausschließliche Vermehrungshemmung, d. h. fungistatische Wirkung, als Dauerzustand nie beobachtet werden. Allerdings wurde bisher nur das Verhalten von Hefen und Schimmelpilzen geprüft, nicht dagegen dasjenige von Bakterien, speziell von sporenbildenden. Dies war dadurch bedingt, daß gerade die Konservierungsmittel, die Gegenstand der vorliegenden Untersuchung sind, im neutralen Bereich so gut wie unwirksam sind.

Die Frage nach der inneren Natur der Wirkung von Konservierungsmitteln auf die Mikrobenzellen ist noch weitgehend ungeklärt. Die hier berichteten Untersuchungen sind eher dazu angetan, zu zeigen, wie viele und komplizierte Probleme hier hereinspielen, als daß sie zur Lösung dieser letzten Fragen beitragen. Als Erklärungsmöglichkeiten werden vielfach Wirkungen entweder auf die Plasmamembran oder auf lebenswichtige Zellenzyme angeführt.

Näheres über die diesbezügliche Literatur ist der Zusammenfassung von Wyss zu entnehmen. Was die Störung der Tätigkeit lebenswichtiger Enzyme durch Konservierungsmittel anbetrifft, so ist daran zu erinnern, daß einschlägige Untersuchungen, z. B. die bekannten Arbeiten von IVANOVICS über die enzymhemmende

Wirkung des Salicylat-Ions oder die Untersuchungen von WRIGHT u. SHEGGS über die Hemmung der Synthese des β -Alanins durch Propionat, durchweg im neutralen pH-Bereich durchgeführt wurden, während für die in der vorliegenden Arbeit behandelten Wirkungen der Konservierungsmittel ausschließlich die undissoziierten Säureanteile verantwortlich zu machen sind.

RAHN (S. 39/40) nimmt an, daß ein Verlauf der Absterbekurve entsprechend einer monomolekularen Reaktion, wie er bei kurzfristiger Abtötung durch hohe Konzentrationen von Konservierungsmitteln beobachtet wurde, nur möglich ist, wenn je Zelle nur 1 Mol getroffen werden muß, um Absterben hervorzurufen. Daher könnten in Fällen, in welchen ein derartiger Absterbeverlauf beobachtet wurde, weder Denaturation von Enzymen, noch solche des Zellplasmas, vermutlich auch nicht Zerstörung der Plasmamembran als Todesursache angenommen werden. Demgegenüber führen ENGELHARD u. HOUTERMANS aus, daß aus einem exponentiellen Abfall der Zeitkurven nicht unbedingt auf einen Eintreffervorgang geschlossen werden kann.

Bereits aus diesen wenigen Literaturzitaten ist ersichtlich, wie mangelhaft unsere Erkenntnisse über die Natur des Absterbens von Mikroben unter der Wirkung von Zellgiften im allgemeinen und von Konservierungsmitteln im besonderen noch sind und wieviel der Forschung noch zu tun übrig bleibt.

Ein weiteres ungeklärtes Problem stellt die Erscheinung dar, daß bei unzureichenden Dosierungen von Konservierungsmitteln ein Teil der vorhandenen Mikroben zunächst abstirbt, bis der Rest dann die Vermehrung erneut aufnimmt. Für diese auf Seite 40ff. beschriebene Erscheinung können zwei Erklärungen in Betracht gezogen werden. Einmal wäre daran zu denken, daß besonders resistente Individuen, die in dem Material von vornherein vorhanden waren oder — wie dies ja bekanntlich auch bei genetisch einheitlichem Material möglich ist — durch Mutation während des Versuches entstanden sind, sich auch in höheren Konzentrationen von Konservierungsmitteln, die den normalen Vertretern der Art keine Lebensmöglichkeit mehr gewähren, vermehren. Die andere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, daß ein Teil der mikrobiologisch wirksamen Substanz von den Mikroben abgebaut oder gespeichert werden muß, wobei ein Teil der Mikroorganismen abstirbt, bis dann in dem an Konservierungsmittel verarmten Substrat wieder Vermehrung möglich ist. Bisher konnte noch nicht eindeutig festgestellt werden, ob die eine oder andere Hypothese oder keine von beiden zutrifft. Daß nicht etwa pH-Änderungen als Ursache der fraglichen Erscheinung in Frage kommen, wurde von mir genau nachgeprüft.

Verhältnismäßig leicht ist einzusehen, warum der Absterberhythmus beim langfristigen Absterben unter der Wirkung niedriger Konservierungsmittel-Konzentrationen in anderer Weise temperaturabhängig ist als derjenige beim kurzfristigen Absterben. Bei der kurzfristigen Abtötung könnte man sich einfach einen chemischen Vorgang vorstellen, der durch höhere Temperaturen beschleunigt wird, während beim langfristigen

Absterben der Giftwirkung irgendwelche Gegenkräfte der Mikroben entgegengerichtet sind, sei es nun einfach die Vermehrung eines anfangs in der Minderheit vorhandenen resistenten Stammes oder irgendwelche Reaktionen mit dem Konservierungsmittel. Jedenfalls ist die Aussicht, daß die Mikroben mittels eines dieser Vorgänge im Kampf mit dem Gift obsiegen, um so größer, je günstiger die sonstigen Lebensbedingungen, zu denen auch die Temperatur gehört, für sie sind.

Ebenfalls ist ohne weiteres zu verstehen, daß ein solches Obsiegen der Mikroben im Kampf mit dem Zellgift nur bei nicht zu hohen Konzentrationen desselben möglich ist.

Zusammenfassung.

Es wurde die Wirkung von verschiedenen hohen Konzentrationen einer Reihe von Konservierungsmitteln auf *Hefen* über längere Zeitabstände verfolgt. Das System Substrat + Konservierungsmittel + Mikroben strebte dabei stets entweder dem Endziel des Absterbens aller vorhandenen Mikroben oder dem der Vermehrung der vorhandenen Mikroorganismen mit den Erscheinungen des makroskopisch sichtbaren Verderbs zu. Eine lediglich in Vermehrungshemmung bestehende rein statische Wirkung der Konservierungsmittel auf die Mikroorganismen wurde nie beobachtet.

Bei genügend hohen Konzentrationen der Konservierungsmittel und entsprechend kurzfristigem Absterben der vorhandenen Mikroorganismen im Verlauf von Minuten entsprach der zeitliche Ablauf des Absterbens sämtlicher vorhandener einzelliger Mikroorganismen, vorausgesetzt, daß es sich um einheitliches Material handelte, ebenso wie der Verlauf des Absterbens unter der Wirkung anderer Zellgifte einer monomolekularen Reaktion.

Bei niedrigen Konzentrationen von Konservierungsmitteln, wenn sich das Absterben über Tage bis Wochen hinzog, wurde allmähliche Verlangsamung des Absterbevorganges, die sogar in Wiederaufleben der Vermehrung übergehen konnte, beobachtet.

Es wurde der Einfluß einer Reihe von Faktoren wie der der Konzentration des Konservierungsmittels, der Temperatur, der Zusammensetzung der Nährlösung auf den zeitlichen Verlauf des Absterbens untersucht.

Literatur.

- ENGELHARD, H., u. TH. HOUTERMANS: Z. f. Naturforsch. 5b, 30 (1950). — FLETT, L. H., R. C. HARING, A. F. GUITERAS, and R. L. SHAPIRO: J. Bacteriology 50, 591 (1945). — IVANOVICS, G.: Naturwiss. 30, 104 (1942). — Z. physiolog. Chemie 276, 33 (1942). — LANDOLT-BÖRNSTEIN: Physikalisch-chemische Tabellen Bd. III. Berlin: Springer 1923, S. 1138; III. Erg.-Bd. 3. Teil, 1936, S. 2105. — RAHN, O.: Injury and death of bacteria by chemical agents. Biodynamica, Normandy, Missouri, 1945. — RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie. 2. Aufl. G. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1952. — v. SCHELHORN, M.: Deutsche Lebensmittelrundschaу 46, 151 (1950a); 47, 170 (1950b); 47, 16 (1951a); Z. Lebensm. Unters. u. Forsch. 92, 256 (1951b). — WRIGHT, S. D., and H. R. SHEGGS: Archiv of Biochem. 10, 383 (1946). — WYSS, O.: Advances in Food Research. Academ. Press, Inc. New York 1, 373 (1948).

(Aus dem Fouad 1st National Council for Scientific Researches, Kairo, Ägypten.)

Über Wechselbeziehungen zwischen Schimmelpilzen.

1. Der Einfluß verschiedener physiologischer Faktoren auf die Wechselbeziehungen zwischen *Alternaria tenuis* und *Fusarium semitectum*.

Von

EZZ-ELDIN M. TAHA.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. März 1953.)

Nachdem HARDER (1911) wohl erstmalig die antagonistischen Wirkungen zwischen 2 Pilzmycelien in PETRI-Schalen mit Nähragar festgestellt hatte, sind die gegenseitigen Wirkungen von verschiedenen Autoren näher analysiert worden. Die Autoren gehen dabei entweder von der Art und Weise aus, in der eine solche Wechselwirkung erfolgt, oder sie unterteilen nach dem Ausmaß des räumlichen Abstands zwischen den miteinander vergesellschafteten und sich gegenseitig beeinflussenden Pilzen.

PORTER (1924) unterschied 5 Arten der Wechselbeziehung zwischen zwei gemeinsam auf einem festen Nährboden wachsenden Pilzen: a) Vermischung; die Hyphen der beiden vergesellschafteten Pilze verwachsen ungehindert miteinander; b) ein Pilz wächst an der Oberfläche über den anderen hinweg, wobei der „unterlegene“ Organismus stets stark gehemmt wird; c) leichte Hemmung; beide Organismen werden gehemmt, wachsen jedoch aufeinander zu, bis sie sich nahezu berühren; alsdann Wachstumsstillstand; d) ein Pilz wächst um den zurückgedrängten Partner herum; e) gegenseitige Hemmung schon in beträchtlichem Abstand zwischen den beiden konkurrierenden Pilzen.

BROADFOOT (1933) dagegen unterschied bei den Wechselwirkungen zwischen Pilzen lediglich 2 Formen: 1. verträgliche; ein Pilz wächst über den anderen; und 2. antagonistische; zwischen den beiden vergesellschafteten Pilzen tritt eine deutliche „neutrale“ Zone oder eine scharf abgegrenzte Trennungslinie auf.

LAL (1939) unterteilte den antagonistischen Typus weiter, und zwar entsprechend dem Abstand zwischen den beiden beteiligten Pilzen in a) streng antagonistische, wenn ein Abstand von 1,5 cm oder mehr auftritt, und b) mäßig antagonistische, wenn der Abstand weniger als 1,5 cm beträgt.

MOUSTAFA (1942) führte eine neue Definition, „semiantagonistisch“, für den Fall ein, daß einer der beiden Pilze im Wachstum gehemmt wird, während der andere ungestört über den unterdrückten Gesellschafter hinüberwächst.

Am ausführlichsten hat zuletzt OPPERMANN (1951) die Wechselbeziehungen zwischen einer großen Anzahl von Pilzen (holzerstörenden *Basidiomyceten*) untersucht. Er hat dabei u. a. 13 Gruppen der gegenseitigen Beeinflussung aufgestellt und in schematischen Zeichnungen festgehalten, wobei vor allem auch die zeitliche Änderung des Verhaltens berücksichtigt wurde. Gleichzeitig beschäftigte sich auch WALLHÄUSSER (1951) mit den antagonistischen Wirkungen von Bodenpilzen aufeinander.

Es war eine Streitfrage, ob der Typus der Wechselbeziehungen zwischen den Pilzen in den Organismen selbst begründet liegt, oder ob er durch experimentelle physiologische Faktoren bedingt ist. Während MACHACEK (1928) fand, daß die Hemmwirkung durch die Pilze in gewissem Grade temperaturabhängig ist, teilte ARRILAGA (1935) mit, daß keine Beziehung zwischen Temperatur und Pilzhemmung bestehe. Später wiederum erachtete MOUSTAFA (1942) die Wechselwirkungen zwischen Pilzen als von einem oder mehreren der folgenden Faktoren abhängig: Temperatur, p_H -Wert und Art des Nährmediums.

Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, das Wesen der Wechselbeziehungen zwischen den beiden Schimmelpilzen *Alternaria tenuis* und *Fusarium semitectum* (beide rufen in Ägypten Tomatenfäule hervor) zu untersuchen. Dabei soll geprüft werden, inwieweit möglicherweise eine Veränderung sowohl der äußeren als auch der physiologischen Faktoren den Typus der Wechselbeziehungen beeinflusst. Daneben werden auch die Verhältnisse beim Wachstum zweier Organismen desselben Pilzes unter veränderten Versuchsbedingungen untersucht. Diese Versuche sollen dazu dienen, das qualitative Verhalten eines Pilzes gegenüber seinen eigenen Metaboliten etwas näher zu beleuchten.

Die hier mitgeteilten Befunde sollen also feststellen, ob die Wechselbeziehung zwischen *Alt. tenuis* und *Fus. semitectum* bzw. zwischen zwei Individuen eines dieser Pilze eine den Organismen selbst innewohnende Eigenschaft ist oder ob sie auf äußere, physiologische Faktoren zurückgeht. Die Versuche umfassen die folgenden Punkte: 1. Wechselbeziehungen bei verschiedenen Temperaturen, 2. Wechselbeziehungen bei verschiedenen p_H -Werten, 3. Wechselbeziehungen auf verschiedenen Nährböden.

Methodik.

Die Kultur der Pilze erfolgte in sterilisierten PETRI-Schalen von 11 cm Ø. Jede Schale enthielt 15 cm³ sterilisierten Agar-Nährboden und wurde mit 2 Scheibchen der betreffenden Pilze beimpft. Die Scheibchen haben einen Durchmesser von 4 mm und werden mit einem sterilisierten Korkbohrer aus 10 Tage alten Dox-Agar-Kulturen herausgestantzt. Der Abstand der Scheibchen wurde in allen Schalen gleich gehalten. In jeder Versuchsreihe wurden 25 Schalen für jede der folgenden Kombinationen angesetzt: a) *Fusarium* + *Fusarium*, b) *Alternaria* + *Alternaria*, c) *Fusarium* + *Alternaria*.

Versuchsergebnisse.

1. Kombinationen bei verschiedenen Temperaturen.

Für das Studium der Pilz-Kombinationen bei verschiedener Temperatur wurden zwei synthetische Nährböden verwendet, und zwar Dox-Agar, in dem die Stickstoffquelle in anorganischer Form (als NaNO₃) vorliegt, und Glucose-Pepton, in dem die Stickstoffquelle organischer Natur ist (Pepton). Auf beiden Nährböden wurde das Pilzwachstum bei 10°, 25° und 30° untersucht. Auf Dox-Agar wurde auch bei 20° eine Versuchsreihe durchgeführt. Die Wachstumsverhältnisse der Pilzmycelien, wie sie sich bei den genannten Kombinationen auf beiden Nährböden und

unter wechselnden Temperaturen ergaben, sind in Tab. 1 mitgeteilt. Sie zeigt folgendes:

Tabelle 1. Wechselbeziehungen zwischen *Alternaria tenuis* und *Fusarium semitectum* bzw. zwei Individuen eines dieser Pilze bei verschiedener Temperatur.

Pilzkombinationen	Dox-Agar				Glucose-Pepton-Agar			
	10° C	20° C	25° C	30° C	10° C	20° C	25° C	30° C
<i>Fusarium</i> + <i>Fusarium</i>	V	V	V	V	A	A	A	A
<i>Alternaria</i> + <i>Alternaria</i>	A	A	A	V	V	V	V	V
<i>Fusarium</i> + <i>Alternaria</i>	A	A	A	A	A	A	A	A

V verträgliche; A antagonistische.

a) Während das Entwicklungsverhältnis zweier Mycelien von *Fusarium* auf Dox-Nährboden innerhalb des untersuchten Temperaturbereichs vorwiegend „verträglich“ ist (beide Kolonien nähern sich gegenseitig unter Vermischung ihrer Hyphen bei 10°, 20° und 25°; bei 30° verwachsen die Hyphen ebenfalls ungehindert miteinander, mit Ausnahme einer deutlichen neutralen Zone im Zentrum), so gestaltet es sich doch auf Glucose-Pepton unter den gleichen Bedingungen ausgesprochen antagonistisch. Dieser Typus einer Wechselbeziehung ändert sich also nicht mit der Versuchstemperatur, wohl aber in ausgesprochenem Maße mit dem Wechsel des Nährbodens.

b) Das Entwicklungsverhältnis zweier Mycelien von *Alt. tenuis* auf Dox-Nährboden ändert sich mit der Versuchstemperatur. Es ist antagonistisch bei niederen Temperaturen bis hinauf zu 25°, darüber hinaus (30°) wird es „verträglich“. Wie aus der relativen Größe und Ausprägung der neutralen Zone ersichtlich, scheint der Hemmungsfaktor bei niederen Temperaturen aktiver zu sein als bei höheren. Auf Glucose-Pepton ist das Verhältnis innerhalb des gesamten untersuchten Temperaturbereiches vom Typus „verträglich“.

c) Das Verhältnis zwischen *Fusarium* und *Alternaria* ändert sich mit wechselnder Temperatur und wechselndem synthetischen Nährmedium nicht. Es ist in allen Fällen antagonistisch.

2. Kombinationen bei verschiedenen pH-Werten.

Die Wechselbeziehungen, die sich bei den genannten Pilz-Kombinationen herausbilden, wurden auch bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Das Kultur-Medium wurde durch Zusatz von Bernsteinsäure-Phosphat-Puffer (35,5 g Na_2HPO_4 und 11,8 g Bernsteinsäure je Liter

Glucose-Pepton) auf hinlänglich konstantem p_H gehalten. Durch Zusatz einer entsprechenden Menge 5 n HCl bzw. 5 n NaOH wurden vier verschiedene p_H -Werte eingestellt. Die Versuche wurden bei verschiedenen Temperaturen, hauptsächlich 10° und 25° durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt und in Abb. 1—3 photographisch dargestellt

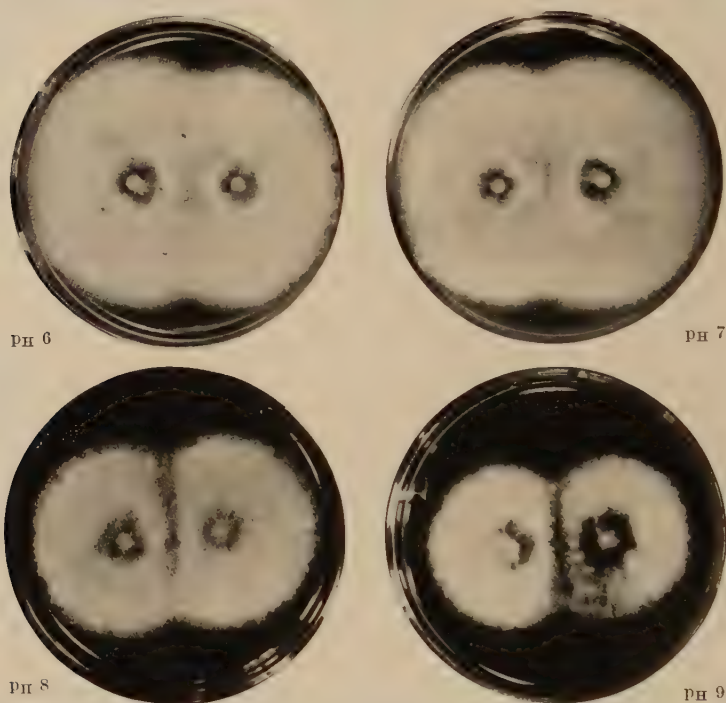


Abb. 1. Wechselbeziehungen zwischen zwei Individuen von *Fusarium semitectum* bei verschiedenem p_H -Wert.

Tabelle 2. Wechselbeziehungen zwischen *Alternaria tenuis* und *Fusarium semitectum* bzw. zwei Individuen eines dieser Pilze bei verschiedenem p_H -Wert.

Pilz-Kombinationen	10° C						25° C					
	p_H 4	p_H 5	p_H 6	p_H 7	p_H 8	p_H 9	p_H 4	p_H 5	p_H 6	p_H 7	p_H 8	p_H 9
<i>Fusarium</i> + <i>Fusarium</i>	V	V	V	V	V	A	V	V	V	V	V	A
<i>Alternaria</i> + <i>Alternaria</i>	V	V	V	A	A	A	V	V	V	A	A	A
<i>Fusarium</i> + <i>Alternaria</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

V verträgliche; A antagonistische.

Es zeigt sich deutlich, daß die Art der Wechselwirkung zwischen den Mycelien desselben Pilzes mit verändertem p_H eine andere wird. Die Beziehungen zwischen den Mycelien zweier *Fusarien* oder zweier *Alternarien*

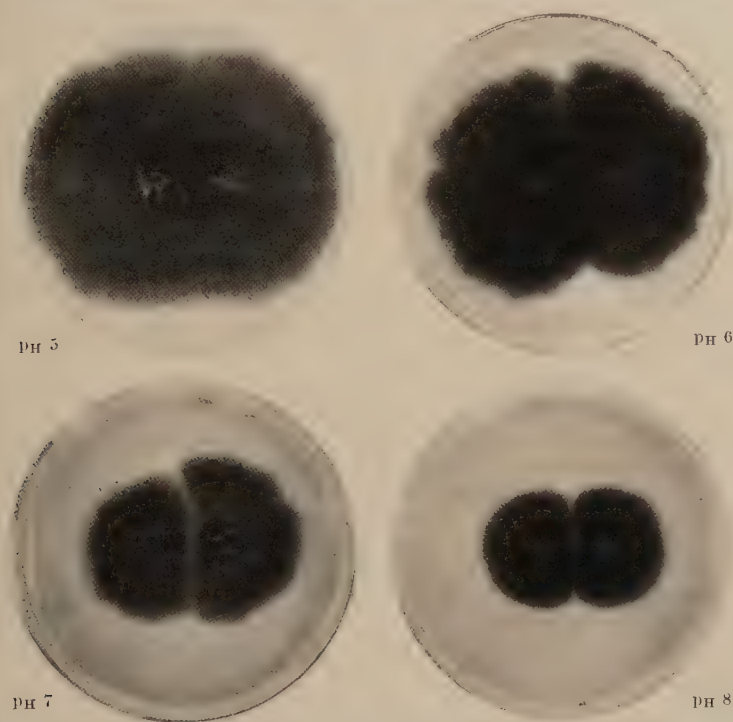


Abb. 2. Wechselbeziehungen zwischen zwei Individuen von *Alternaria tenuis* bei versch. p_H -Wert.

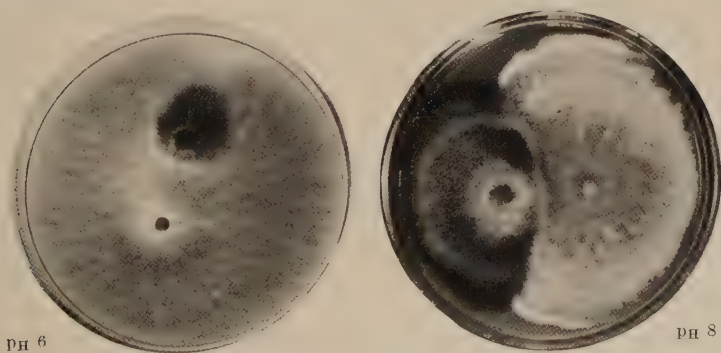


Abb. 3. Wechselbeziehungen zwischen *Alternaria tenuis* u. *Fusarium semitectum* bei versch. p_H -Wert.

sind bei niederen p_H -Werten vom Typus „verträglich“, werden aber bei höherem p_H antagonistisch. Wie aus der relativen Größe und

Deutlichkeit der neutralen Zone ersichtlich, ist offenbar der Hemmungs-faktor bei höheren p_H -Werten wirksamer.

Das wechselseitige Verhältnis zwischen *Fusarium* und *Alternaria* scheint dagegen ziemlich unabhängig von p_H - und Temperatureinflüssen zu sein, denn es ist stets antagonistisch, und in der „Kontaktzone“ tritt eine deutliche Trennungslinie zwischen beiden Pilzen auf.

Die vorliegenden Befunde über das unterschiedliche Verhalten zweier *Alternaria*- bzw. *Fusarium*-Mycelien infolge einer p_H -Änderung bei konstanter Temperatur stimmen mit den früheren Beobachtungen von MOUSTAFA (1942) überein, der diese Befunde einer oder beiden der folgenden Ursachen zuschrieb: a) die von den Pilzen produzierte hemmende Substanz wechselt entweder in Quantität oder Qualität mit der Änderung des p_H -Wertes des Mediums, b) die hemmende Substanz wird in einem weiten p_H -Bereich gebildet, ist aber bei einem bestimmten p_H wirksamer als bei einem anderen.

3. Kombinationen auf verschiedenen Medien.

Die bisher mitgeteilten Versuche hatten erwiesen, daß die Wechselbeziehungen zwischen den Pilzen stark von der Natur des Nährmediums abhängig sind. Es konnte gezeigt werden, daß sich zwei Mycelien desselben Pilzes auf Glucose-Pepton-Agar anders verhalten als auf Dox-Agar. Während nämlich die beiden Mycelien von *Fusarium* auf Dox-Agar „Verträglichkeit“ zeigen, erweisen sie sich auf Glucose-Pepton-Agar bei derselben Temperatur als antagonistisch. Andererseits ist das Verhältnis zweier *Alternaria*-Kolonien auf Dox-Agar überwiegend antagonistisch, auf Glucose-Pepton-Agar jedoch „verträglich“.

Diese Unterschiede im Typus der Wechselbeziehungen waren nun der Anlaß zu Untersuchungen über das Verhalten der Pilze auf Tomatenextrakt-Nährböden. Es sollte festgestellt werden, ob dabei eine Abhängigkeit von der zur Herstellung des Nährbodens verwendeten Tomaten-Varietät erkennbar wird. In den vorliegenden Versuchen wurden Extrakte aus reifen Früchten dreier verschiedener Varietäten benutzt: *Pritchard*, *Nord-Dakota* und *IAB*. Die Herstellung des Tomatenextrakt-Agars erfolgte nach der in einer früheren Arbeit (TAHA 1949) beschriebenen Methodik. Über das Verhalten der Pilze auf diesen drei Tomatenextrakten gibt Tab. 3 Aufschluß.

Die Ergebnisse zeigen, daß auch hier die antagonistischen Beziehungen zwischen *Alternaria* und *Fusarium* durchaus erhalten bleiben, sowohl auf den verschiedenen Extrakten als auch unter den wechselnden Versuchstemperaturen.

Auf *Nord-Dakota*-Nährböden ändert sich der Typus der Wechselwirkung zwischen den Mycelien zweier *Fusarien* mit der Temperatur. Sie verhalten sich bei 25° „verträglich“, bei 10° und 30° dagegen antagonistisch. Ebenfalls antagonistisch sind die Beziehungen auf den beiden anderen Tomatenvarietäten bei verschiedener Versuchstemperatur.

Ähnlich ist auch die Wechselwirkung zwischen zwei *Alternaria*-Mycelien auf allen Tomaten-Varietäten und bei verschiedener Temperatur stets antagonistisch (mit Ausnahme des bei 30° „verträglichen“ Verhältnisses auf IAB-Nährböden).

Tabelle 3. Wechselbeziehungen zwischen *Alternaria tenuis* und *Fusarium semitectum* bzw. zwei Individuen eines dieser Pilze auf verschiedenen Tomatenextrakt-Nährböden.

Pilz-Kombinationen	10° C			25° C			30° C		
	Pritch.	N. D.	IAB	Pritch.	N. D.	IAB	Pritch.	N. D.	IAB
<i>Fusarium</i> + <i>Fusarium</i>	A	A	A	A	V	A	A	A	A
<i>Alternaria</i> + <i>Alternaria</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	V
<i>Fusarium</i> + <i>Alternaria</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A

V verträgliche; A antagonistische; Pritch. Pritchard Tomatenextrakt; N. D. Nord Dakota Tomatenextrakt; IAB IAB Tomatenextrakt.

Zusammenfassung.

Die vorliegenden, rein qualitativen Untersuchungen über Pilz-Assoziationen auf festen Nährböden haben gezeigt, daß der Typus der Wechselbeziehungen zwischen *Alternaria* und *Fusarium* gänzlich unabhängig ist von Veränderungen der Temperatur, des pH-Wertes oder der Zusammensetzung des Nährmediums. Er ist stets antagonistisch.

Andererseits werden die Beziehungen zwischen zwei Mycelien eines und desselben Pilzes (entweder *Fusarium* oder *Alternaria*) in hohem Maße beeinflusst von Änderungen im pH-Wert oder der Zusammensetzung des Nährmediums, sowie — in gewissem Grade — auch von einer Veränderung der Temperatur.

Literatur.

ARRILAGA, J. G.: Phytopathology **25**, 8 (1935). — BROADFOOT, W. C.: Canad. Journ. Res. **8**, 545 (1933). — HARDER, R.: Naturwiss. Z. f. Forst- u. Landw. **9**, 129 (1911). — LAL, A.: Annals appl. Biol. **26**, 247 (1929). — MACHACEK, Mc. gill. univ. Tech. Bull. No. 7 (1929). — MOUSTAFA, A.: PH. D. Thesis Cambridge univ. (1942). — OPPERMANN, A.: Arch. f. Mikrobiol. **16**, 364 (1951). — PORTER, C. L.: Amer. Journ. Bot. **11**, 168 (1924). — TAHA, E. D.: M. Sc. Thesis Fouad I univ. Kairo (1949). — WALLHÄUSSER, K. H.: Arch. f. Mikrobiol. **16**, 201 (1951).

(Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg.)

Die Bakterienflora der medizinischen Blutegel.

Von

K.-H. BÜSING, W. DÖLL und K. FREYTAG,

Mit 18 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. März 1953.)

Über Bakterienfunde in und an medizinischen Blutegeln (*Hirudo officinalis* und *H. medicinalis*) sind seit den ersten Mitteilungen von LEUKKART u. BRANDES zwar im Laufe der letzten Jahre weitere Veröffentlichungen (STEFFENHAGEN u. ANDREJEW, FERMI u. CANO, REICHENOW, ZIRPOLO, JASCHKE, DINAND u. BOTTENBERG, SCHWEIZER, MOOTZ, LEHMENSICK, HORNBORSTEL) erschienen. Aber entweder beschränken sich diese Mitteilungen auf vorwiegend mikroskopisch-morphologische Beschreibungen der Bakterien oder enthalten nur so unvollständige Angaben über die mehr oder weniger rein gezüchteten Bakterienarten, daß eine Wiedererkennung oder gar Klassifizierung derselben kaum möglich ist. Wir setzten uns daher zum Ziel, unter teilweiser Nachprüfung früherer Befunde eine möglichst eingehende Kenntnis über die in und an Blutegeln anzutreffende Bakterienflora zu gewinnen und nach Möglichkeit auch die physiologischen bzw. symbiontischen Beziehungen dieser Bakterien zu ihrem Wirt aufzuklären.

I. Anatomisch-physiologische Vorbemerkungen über *Hirudo*.

Indem wir bezüglich eingehender Darstellungen der Anatomie, Physiologie und Ökologie der Spezies *Hirudo* auf die zoologische Literatur verweisen, seien hier einleitend nur diejenigen anatomischen und physiologischen Daten kurz skizziert, die insbesondere dem Nicht-Zoologen die Kenntnis vermitteln sollen, die für das Verständnis der in den späteren Abschnitten behandelten Fragen notwendig sind.

a) Anatomie.

H. officinalis und *H. medicinalis* gehören zur Klasse der *Anneliden* und besitzen als Vertreter der Ordnung *Hirudineen* folgende Merkmale: Der dorsoventral abgeplattete Körper wird bis zu 15 cm lang und besitzt eine Breite von 1–2 cm. Das Gewicht beträgt je nach Alter und Größe der Tiere 0,5–15 g. — Die dunkel bis schwarz-grün gefärbte Dorsalseite weist 4 rotbraune, fleckige Längsstreifen auf. *H. officinalis* ist auf der Ventralseite gleichmäßig hellgrün, *H. medicinalis* mehr fleckig, gelblich grün gefärbt. Es bestehen jedoch bezüglich der Färbung Übergänge zwischen beiden Varianten. — Die bei den *Anneliden* sonst charakteristische, sekundäre Leibeshöhle ist durch die mächtige Mesenchymentwicklung bei *Hirudo* fast unterdrückt. Als Rest eines Coeloms ist nur das Blutgefäßsystem mit einem Bauch- und zwei Seitengefäßen erhalten. — Der Hautmuskelschlauch, der auf der Außenseite mit zahlreichen schleimproduzierenden Drüsen ausgestattet ist, besteht aus

Ring-, Diagonal- und Längsmuskelschichten. — 17 segmental angeordnete Nephridien-Paare sorgen für die Harnausscheidung. — *Hirudineen* sind Zwitter; eine Reihe segmental angelegter Hoden entleeren ihre Sekrete durch kurze, ventral ausmündende vasa deferentia. Der Ausführungsgang des Ovariums mündet gleichfalls nahe der ventralen Mittellinie. Der Verdauungstrakt (Abb. 1) beginnt mit der Mundhaftscheibe, an welche sich der Pharynx anschließt; an der Innenseite des Pharynxeinganges befinden sich 3 radiär gestellte, reich bezahnte Kiefer, an denen auch die Ausführungsgänge der Speicheldrüsen münden. An den Pharynx schließt sich der Vorderdarm bzw. Mitteldarm an, welcher mit seinen zahlreichen seitlichen Blindsäcken den größten Teil der Leibeshöhle ausfüllt; an ihn schließt sich ein kurzer, enger Enddarm an, der sich kurz vor der Afteröffnung zu einer Rectalblase erweitert. — Das Nervensystem besteht aus dem Bauchmark mit segmentalen Ganglien.

b) Ökologie.

Man findet Blutegel in Tümpeln und Teichen oder in langsam fließenden Gewässern, wobei kalkarmes Wasser bevorzugt wird. Im Winter oder bei Austrocknung eines Tümpels verkriechen sich die Egel in dem weichen schlammigen Boden, den sie im Frühjahr an warmen Tagen wieder verlassen. Außerhalb des Wassers trifft man medizinische Blutegel gewöhnlich nicht an, obwohl sie die Fähigkeit besitzen, in feuchtem Moos oder in Bohrhöhlen des Ufers längere Zeit zu leben. Trotz der stets vorhandenen Schleimschicht, die durch Harnflüssigkeit feucht gehalten wird, ist der Egel gegen äußere Trockenheit ziemlich empfindlich. Die geographische Verbreitung der medizinischen Blutegel war früher wesentlich größer als heute; in Deutschland ist der Bestand an Blutegeln (*H. medicinalis*) durch die starke Sammeltätigkeit in den letztvergangenen Jahrhunderten sowie durch Trockenlegung von Sümpfen, Flußregulierungen usw. stark zurückgegangen. Erst in neuerer Zeit scheint *H. medicinalis* auch in den Gewässern Westdeutschlands wieder an Zahl zuzunehmen. Die für den medizinischen Bedarf bereitgestellten Egel stammen in Deutschland entweder aus Zuchtanstalten oder aus Importen vom Balkan (*H. officinalis*).

c) Physiologie.

Die Nahrung der medizinischen Blutegel besteht ausschließlich aus Blut. Bei der Nahrungsaufnahme saugt sich der Blutegel mit der vorderen Haftscheibe fest und schlägt durch sägende Bewegungen der 3 Kiefer eine Wunde. Der stark kontrahierte Teil des Hautmuskelschlauches bildet dabei das Widerlager für die Muskeln, welche den Kiefer bewegen. Zwischen den Zähnen der Kiefer münden die Ausführungsgänge der peripharyngealen Drüsen, die das von HAYKRAFT entdeckte, blutgerinnungshemmende Hirudin absondern. Durch Pumpbewegungen der Muskulatur wird das Blut aus der Saugwunde in den Schlund emporgehoben und in die Blindsäcke des Vorderdarmes verstaут. Über die Aufschließung und Resorption der Blutnahrung bestehen noch weitgehende Unklarheiten. Darneigene Sekretionsenzyme sind bei Blutegeln bisher nicht einwandfrei nachgewiesen worden (DIWANY, GRAETZ u. AUTRUM, KRUKENBERG, HERTER). Es wird daher in der zoologischen Literatur

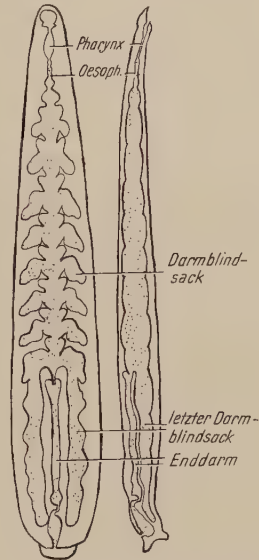


Abb. 1. Darmkanal des Blutegels (aus KÜKENTHAL; verändert). $\frac{3}{4}$ d. natürl. Größe.

hypothetisch mit einer „Phagocytose“ der Blutnahrung durch die Darmwandzellen oder einem Abbau durch Enzyme des Nahrungsblutes gerechnet. Auf diese Fragen wird im III. Abschnitt ausführlicher eingegangen werden.

Harnsekretion. Morphologisch ist das Nephridialorgan in drei Abschnitte gegliedert: das Wimperorgan oder der Trichter; der drüsige Teil; die Endblase mit Ausführungskanal.

Das Wimperorgan (Abb. 2) ragt in eine Blutlacune des Coeloms und strudelt die chemotaktisch angelockten Botryoidzellen, die mit Stoffwechselendprodukten beladen sind, durch den Trichter in einen bläschenförmigen Hohlraum: das Receptaculum. Hier werden die Stoffwechselprodukte unter Zerfall der Botryoidzellen frei; sie werden von den Wandzellen des Receptaculums resorbiert und gelangen in den drüsigen Mittelabschnitt des Nephridiums. Hier findet anscheinend die eigentliche Harnbereitung statt. Der Harn sammelt sich in den distalwärts immer größer

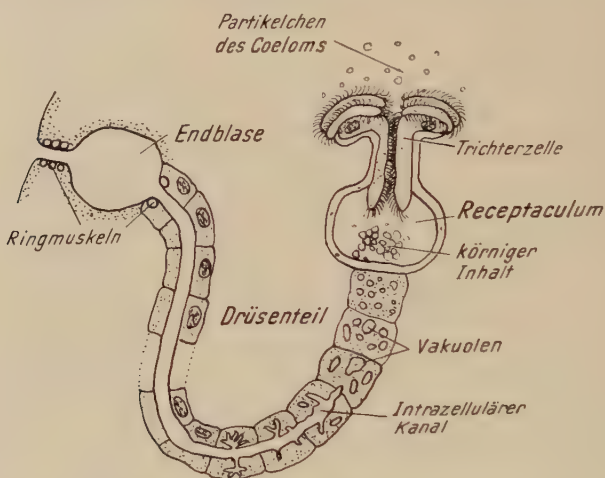


Abb. 2. Schema des *Hirudineen*-Nephridiums (nach GRAF aus HERTER; etwas verändert).

werdenden Vacuolen der Drüsenzellen. Diese Vacuolen verbinden sich im unteren Abschnitt zu anfangs feineren, dann breiter werdenden Kanälen, die schließlich in einen geschlossenen Sammelkanal einmünden, der zur Harnblase führt (nach KOWALEWSKI). Einzelheiten über den histologischen Aufbau der Harnblase werden im Abschnitt IV noch näher ausgeführt werden.

Fortpflanzung. Die Fortpflanzung der *Hirudineen* erfolgt durch Ablage der befruchteten Eier in einen Kokon, welcher durch Abscheidung einer eiweißhaltigen Flüssigkeit von den Drüsen der Clitellarregion gebildet wird. Der zunächst bandförmig dem Egelkörper anliegende Kokon wird kopfwärts abgestreift und in Bohrlöcher der Uferböschung abgelegt. Er enthält bis zu 15 Eier, aus denen sich die Jungegel entwickeln und später aus dem Kokon ausschlüpfen.

II. Allgemeine Versuchsbedingungen.

Die zu unseren Versuchen dienenden Blutegel wurden teils in sauberen Steingutgefäßen mit klarem (chlorfreiem) Wasser, teils in Vollglas-Aquarien, vor direkter Sonnenbestrahlung und stärkeren Temperaturschwankungen geschützt, aufbewahrt. Der Boden der Aquarien war mit einer schräg ansteigenden, sandhaltigen Lehm-schicht bedeckt, so daß noch eine flache Uferböschung den Wasserspiegel überragte.

— Fütterung der Tiere fand nur zu bestimmten Versuchszwecken statt; im übrigen wurden sie über Monate nüchtern gehalten. Die Fütterung erfolgte in der Weise, daß wir die Tiere an mit defibriertem Hammelblut gefüllten und mit einem Stück Schweinsblase verschlossenen Reagensglas saugen ließen. — Die äußerliche Desinfektion der zur Präparierung von Organen bestimmten Tiere geschah durch gründliches Abwischen mit einem in 2% iger Sagrotanlösung oder 70% igen Alkohol getauchten Wattebausch. — Alle zur Präparierung und zu Probeentnahmen verwendeten Instrumente (Scheren, Spritzen, Kanülen, Pipetten usw.) waren vorchriftsmäßig sterilisiert.

III. Die Darmflora.

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 50 normalen, gesunden, teils hungernden, teils gefütterten Blutegeln der Species *Hirudo officinalis* und *H. medicinalis* ausgeführt.

Zur bakteriologischen Untersuchung des Darminhaltes wurden Proben desselben teils mittels Einführung einer Glaskanüle in den Enddarm, teils nach Tötung äußerlich desinfizierter (Alkohol, Sagrotan) Egel und Öffnung von der Ventral- und Dorsalseite mit sterilen Instrumenten aus verschiedenen Abschnitten des Vorderdarms bzw. den Darmblindsäcken und dem Enddarm gewonnen. Die Proben wurden mittels Platinöse auf feste Nährböden (gewöhnl. Nähragar, Traubenzuckeragar, Blutagar) ausgestrichen. Die beimpften Nährböden wurden bei 37 oder 22° C bebrütet.

Diese Untersuchungen ergaben ausnahmslos, daß sich im Darminhalt stets nur eine Keimart, und zwar die von BÜSING (1951) beschriebene *Pseudomonas hirudinis* nachweisen ließ. Zweifellos ist dieses Bakterium, das selbst bei Anwendung einfachster bakteriologischer Technik aus jedem Blutegel in Reinkultur erhalten werden kann, auch schon in den Händen früherer Untersucher gewesen. Wahrscheinlich ist das bereits von STEFFENHAGEN und ANDREJEW als „coliähnlich“ beschriebene Kurzstäbchen, welches sie aus Blutegeln isolierten, mit *Ps. hirudinis* identisch. Auch FERMI u. CANO, MOOTZ, LEHMENSIEK sowie HORNBOSTEL fanden anscheinend dieses Bakterium und kamen auf Grund ihrer lückenhaften Untersuchungen zu der irrümlichen Auffassung, daß es sich um eine Abart des *Bacterium coli*, „*Coli imperfectum*“ oder „Kaltblüter-Coli“ handle. Durch die Untersuchungen von BÜSING (1951) ist jedoch klar gestellt worden, daß der Darmbewohner des Blutegels nicht in die Familie der *Enterobacteriaceen* eingereiht werden kann, sondern auf Grund seiner morphologischen und biochemischen Daten zur Familie der *Pseudomonadaceae*, Stamm: *Pseudomonadeae*, Genus: *Pseudomonas*, gestellt werden muß. Und zwar gehört er einer Untergruppe des Genus *Pseudomonas* an, für die wegen ihrer Fähigkeit zur Gasbildung aus verschiedenen Zuckern von maßgebenden Systematikern (KLUYVER u. VAN NIEL, MILES u. a.) die Bezeichnung *Aeromonas* vorgeschlagen worden ist (SNIESKO).

a) *Pseudomonas hirudinis*.

Indem bezüglich der Einzelheiten auf die Ausführungen von BÜSING verwiesen wird, seien kurz die wesentlichsten charakterisierenden Daten über *Ps. hirudinis* zusammengestellt:

Morphologie. Gramnegatives, kurzes, plumpes ($0,7-1,0 \mu$; $1,5-2,0 \mu$), durch polare, monotriche Begeißelung (Abb. 3) lebhaft bewegliches Stäbchen. Keine Sporen.

Kultur. Üppiges Wachstum auf allen gebräuchlichen Nährböden zwischen 10 und 40°C . Aerob, fakultativ anaerob. — Kolonieförmig, -farbe, -konsistenz: „coli-ähnlich“. Auf Endoagar: nach 24 Std trübgraue Kolonien mit punktförmigem, rotem



Abb. 3. *Pseudomonas hirudinis*. Geißelfärbung nach SOUS. Vergr. 2200fach.

Zentrum; Gesamteindruck: schwach rosa. Nach Stehenlassen bei Zimmertemperatur oder auch fortgesetzter Bebrütung bei 37°C im Verlauf der folgenden Tage zunehmende Rotfärbung der Kolonien, jedoch nicht des Nährbodens. — Auf Blutagar: nach 24 Std kräftige β -Hämolyse. — Auf oder in hitzeerstarrtem Serum bzw. LOEFFLER-Serum: kräftige Proteolyse; kein foetider Geruch. — Auf oder in Gelatine: rasche Verflüssigung.

Biochemische Prüfung. Dextrose, Galaktose, Maltose, Saccharose, Mannit, Stärke und Glycerin werden unter Gasbildung vergoren. Lactose wird in den ersten 10 Tagen nicht, aber später langsam angegriffen. — Aeskulin wird gespalten. — Nitrat wird zu Nitrit reduziert. — Schwache H_2S -Bildung in

Cystinbouillon, nicht in Leberbouillon. Schwache Indolbildung in Trypsinbouillon. — Citratverwertung +. Voges-Proskauer-Reaktion (in der Modifikation von WERNIG): negativ. — Harnstoffspaltung: positiv.

b) Die Bedeutung von *Ps. hirudinis* für die Verdauungsphysiologie von *Hirudo*.

Wie bereits im I. Abschnitt ausgeführt wurde, ist der Nachweis darmeigener proteolytischer Sekretionsenzyme bei Blutegeln bisher nicht einwandfrei gelungen (DIWANY, GRAETZ u. AUTRUM, KRUKENBERG). Die einzige positive Aussage hierüber stammt von KORZHUEV u. KHUDALBERDEEV; sie fanden angeblich nur in dem kaum 2,5 cm langen Enddarm Verdauungsfermente, wobei es allerdings nach wie vor offen bleibt, ob es sich hierbei tatsächlich um darmeigene Sekretionsenzyme handelt. HERTER ist von dem Fehlen darmeigener Sekretionsenzyme so überzeugt, daß er Hypothesen wie die von der Resorption des unveränderten Nahrungsblutes bzw. von der Vorverdauung durch nahrungsbluteigene Enzyme ernsthaft in Erwägung zieht.

Nach Auffindung und Identifizierung regelmäßig im Egeldarm vorkommender Bakterien war es natürlich sehr naheliegend, ein Symbioseverhältnis oder genauer: eine Beziehung dieser Bakterien zur Verdauungsphysiologie des Blutegels in Erwägung zu ziehen. Eine gewisse Berechtigung erfuhr diese Hypothese erst, als nachgewiesen werden konnte, daß der Darmbewohner des Blutegels in der Lage ist, die korpuskulären und großmolekularen Bestandteile des Wirbeltierblutes zumindest in vitro enzymatisch anzugreifen (BÜSING 1951). Ein

schlüssiger Beweis für ein echtes Symbioseverhältnis im strengeren Sinne wurde jedoch von uns in dieser Tatsache noch nicht erblickt. Vielmehr glaubten wir von einem Beweis erst dann sprechen zu können, wenn es gelänge, nachzuweisen, daß 1. *Ps. hirudinis* im lebenden, gefütterten Blutegel analoge Veränderungen des Nahrungsblutes wie in vitro hervorruft und daß 2. in Blutegeln, die auf irgendeine Weise von ihrer normalen Darmflora befreit worden waren (Trennung der Symbiose), diese Veränderungen des Nahrungsblutes nicht mehr eintreten würden. Wir gelangten damit zur Anstellung folgender Versuche: 1. Bestimmung der Erythrocytenresistenz des Nahrungsblutes in vivo und vitro, in An- und Abwesenheit von *Ps. hirudinis*, 2. Verfolgung der Proteolyse in vivo und in vitro in An- und Abwesenheit von *Ps. hirudinis*.

Methodische Voraussetzung für diese Versuche war, daß ein Weg gefunden wurde, der es gestattete, ohne Schädigung der Blutegel eine vollständige und nachhaltige Vernichtung der Darmflora herbeizuführen. Dies gelang nach einigen Versuchen einwandfrei mit Chloromycetin (Chloramphenicol)¹. *Ps. hirudinis* wird von Chloromycetin bis in eine Konzentration von 5 γ /ml völlig gehemmt. Chloromycetin ist auch in Lösung (physiol. NaCl oder Nährbouillon) ziemlich stabil; so hatte z. B. eine 4 Wochen im Eisschrank aufbewahrte chloromycetinhaltige Nährbouillon nichts von ihrer keimhemmenden Wirkung eingebüßt.

Das Chloromycetin (Chl.) wurde den Blutegeln folgendermaßen verabreicht: Steriles, defibriniertes Hammelblut wird in sterilen Reagensgläsern mit Chl. in einer Konzentration von 1 mg Chl./ml versetzt, die Reagensgläser mit steriler Schweinsblase verschlossen, auf 37° C erwärmt und den Egel unter Wasser angeboten. Die Egel beißen meist ohne weiteres an; gegebenenfalls müssen sie durch leichtes Anritzen der Schweinsblase bis zum Austritt eines Bluttröpfens angelockt werden. Die Tiere nehmen auf diese Weise durchschnittlich etwa 3,8 ml Blut auf.

Der Chl.-Gehalt des verabreichten Blutes lag somit 200mal höher als zur vollständigen Wachstumshemmung von *Ps. hirudinis* erforderlich ist. Irgendwelche Anzeichen von Unverträglichkeit oder gar toxischer Wirkungen auf die Egel waren bei dieser Chl.-Menge nicht zu beobachten. Wiederholte Kontrolluntersuchungen an chloromycetingefütterten Blutegeln (= Chl.-Egel) ergab Sterilität des Darminhaltes. Hiermit waren die Voraussetzungen für die geplanten Versuche geschaffen.

1. Die Erythrocytenresistenz gegenüber hypotonischen Kochsalzlösungen unter verschiedenen Bedingungen.

Aus der Tatsache, daß man noch nach längerer Zeit (Wochen bis Monate) im aufgenommenen Nahrungsblut von Egel morphologisch intakte Erythrocyten feststellen kann, hat man geschlossen, daß das

¹ Antibioticum aus *Streptomyces venezuelae* mit bacteriostatischer und bactericider Wirkung vorwiegend auf gramnegative Bakterien.

Nahrungsblut in den Blindsäcken des Vorderdarms über Wochen bis Monate unverändert bleibe, sich also auch keine nennenswerten Stoffwechselvorgänge abspielten (PÜTTER), und FUKUI glaubt gar, daß im Vorderdarm überhaupt keine Andauung des Nahrungsblutes stattfindet. Wir werden im nächsten Abschnitt zeigen, daß tatsächlich schon nach wenigen Tagen einwandfrei meßbare chemische Veränderungen des Nahrungsblutes in vivo erfolgen. Daß hierbei auch die Erythrocyten in Mitleidenschaft gezogen werden, wird in den nachstehenden Versuchen geschildert.

Selbst wenn man von der zunächst hypothetischen Voraussetzung ausgeht, daß *Ps. hirudinis*, die auf Blutagar bei 37° C innerhalb 24 Std eine völlige Hämolyse bewirkt, diese Fähigkeit auch im Darm des Blutegels ausübt, ist nicht zu erwarten, daß das gesamte Nahrungs-Blut innerhalb 24 Std oder auch innerhalb der ersten Tage und Wochen völlig hämolytisch wird. Sowohl die Bildung wie auch die Aktivität der Bakterien-Hämotoxine ist von der Temperatur abhängig; sie werden in maximaler Menge bei 37° C gebildet (BÜSING 1950) und wirken auch bei dieser Temperatur auf Erythrocyten am stärksten. Im Blutegeldarm bei niedrigerer Temperatur ist daher nur mit einer langsam fortschreitenden, sich über Wochen erstreckenden Hämolyse des Nahrungsblutes zu rechnen. Man kann den Beginn dieses Vorganges jedoch durch Messung der Erythrocytenresistenz (Technik s. b. HALLMANN) bereits innerhalb weniger Tage erkennen; sie nimmt unter dem Einfluß der von *Ps. hirudinis* gebildeten Hämotoxine sehr schnell ab.

Versuch (Tab. 1): 1. Es wurde zunächst die Erythrocytenresistenz des zur Verfüttung bestimmten, sterilen, defibrinierten Hammelblutes mit und ohne Chl.-Zusatz (1:1000) bestimmt. 2. Die gleichen Hammelblutproben wurden 7 Tage lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt und anschließend abermals die Resistenz gemessen. 3. Von den gleichen Hammelblutproben wurde ein Teil an Blutegel verfüttert und nach 7 Tagen die Erythrocyten-Resistenz des Chl.-haltigen und Chl.-freien Nahrungsblutes gemessen. Die zur Bestimmung erforderlichen Blutmengen wurden durch Aufpräparierung der Egel gewonnen. 4. Ferner wurde eine Probe Hammelblut mit *Ps. hirudinis* beimpft, 7 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend die Resistenzbestimmung vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 1 dargestellt.

Der Versuch hatte somit folgendes Ergebnis: 1. Defibriniertes Hammelblut, 7 Tage bei Zimmertemperatur steril aufbewahrt, zeigt ein leichtes Absinken der Erythrocyten-Resistenz (vgl. 1 mit 2). 2. Mit Chl. 1:1000 versetztes Hammelblut, 7 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt, zeigt gleichfalls eine geringgradige Abnahme der Erythrocyten-Resistenz (vgl. 3 mit 4). 3. Defibriniertes, an Egel verfüttertes Hammelblut zeigt nach 7 Tagen eine beträchtliche Abnahme der Erythrocyten-Resistenz (vgl. 1 und 2 mit 5). 4. Mit Chl. 1:1000 versetztes, an Egel verfüttertes Hammelblut bleibt bezüglich der Erythrocyten-Resistenz

völlig unverändert (vgl. 3 und 4 mit 6). 5. Mit *Ps. hirudinis* beimpftes, defibriniertes Hammelblut zeigt nach 7 Tagen eine gleichstarke Abnahme der Erythrocyten-Resistenz wie normales (Chl.-freies), an Egel verfüttertes Blut.

Tab. 1. *Erythrocyten-Resistenz von Blut bei verschiedener Behandlung.*

	Beginnende Hämolyse bei einer NaCl-Konzentration von	Völlige Hämolyse
1. Defibriniertes Hammelblut in vitro	0,54%	0,34—0,36%
2. Dasselbe nach 7 Tagen	0,64%	0,4%
3. Defibriniertes Hammelblut mit Chl. 1:1000 in vitro.	0,54%	0,34—0,36%
4. Dasselbe nach 7 Tagen	0,56%	0,38%
5. Verfüttertes Hammelblut 7 Tage nach Aufnahme.	über 0,7%	0,52%
6. Verfüttertes Chl.-Hammelblut 7 Tage nach Aufnahme	0,56%	0,4%
7. Mit <i>Ps. hirudinis</i> beimpftes Hammelblut nach 7 Tagen in vitro	über 0,7%	0,52%

Mit diesen Versuchsergebnissen scheint nunmehr bewiesen, daß die Hämolyse des Nahrungsblutes im Egeldarm nur durch *Ps. hirudinis* bewirkt wird und daß diese Veränderungen bereits wenige Tage nach Nahrungsaufnahme festgestellt werden können. Hypothetisch könnte noch der Einwand gemacht werden, daß vielleicht das Chloromycetin nicht nur auf *Ps. hirudinis* hemmend, sondern auch auf die vielleicht doch vorhandenen Sekretionsenzyme des Egeldarms inaktivierend wirken könne; wir glauben jedoch, daß man die Beantwortung dieser Frage denjenigen Forschern überlassen darf, denen die Darstellung darमेigener Sekretionsenzyme beim Blutegel einmal gelingen sollte. Bis dahin halten wir an Hand der vorgelegten und noch folgenden (s. u.) Versuchsergebnisse daran fest, daß die Auflösung der Erythrocytenmembran im Blutegeldarm ausschließlich das Werk der *Ps. hirudinis* ist.

2. Die Eiweißverdauung im Egeldarm und in vitro bei An- und Abwesenheit von *Ps. hirudinis*.

Als Maßstab für die hydrolytische Spaltung der Eiweißkörper bis herab zu kleinmolekularen Eiweißbruchstücken (Oligopeptide, Aminosäuren, Kreatin, Harnsäure usw.) wählten wir die laufende Kontrolle der sogenannten Reststickstoffkörper, welche als Intermediär- oder Endprodukte des Eiweißstoffwechsels sowohl im Wirbeltierorganismus als auch im bakteriellen Zersetzungsprozeß auftreten. Wirbeltierblut enthält normalerweise etwa 25—28 mg% Rest-N, der sich mit der bekannten

Methode von KJELDAHL nach Fällung der mit Trichloressigsäure koagulablen Eiweißkörper im Filtrat nach Veraschung in konzentrierter Schwefelsäure und Überführung in Ammoniumsulfat titrimetrisch feststellen läßt.

Vorversuch in vitro.

Eine Probe sterilen defibrinierten Hammelblutes wird in zwei Portionen geteilt; die eine Portion wird mit *Ps. hirudinis* beimpft, die andere während der Versuchsdauer steril aufbewahrt. In längeren Zeit-

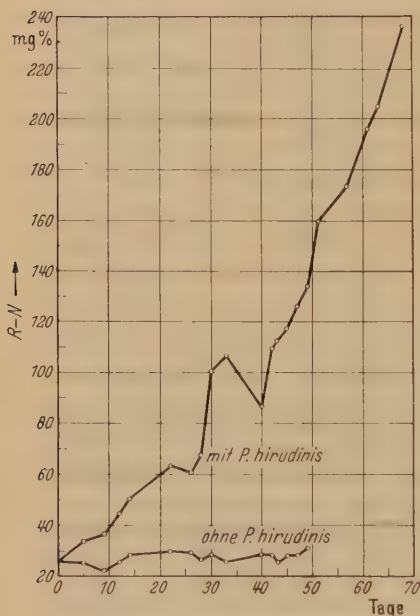


Abb. 4. Rest-N-Änderungen in vitro.

abständen werden von beiden Portionen Proben zur Rest-N-Bestimmung entnommen (vgl. Abb. 4). Durch die Proteolyse des *Ps. hirudinis* tritt somit eine ständige Zunahme der Rest-N-Körper in der betr. Blutprobe ein, während der Rest-N-Gehalt der steril aufbewahrten Probe praktisch unverändert bleibt.

Vorversuch betr. Wasserausscheidung frisch gefütterter Egel.

Da es bekanntlich (PÜTTER) bei frisch gefütterten Blutegeln unmittelbar nach der Blutaufnahme zu einer starken Wasserabscheidung durch die Nephridien und damit zu einer entsprechenden Eindickung des Nahrungsblutes kommt, war bei den beabsichtigten Messungen der Rest-N-Körper im Nahrungsblut damit zu rechnen, daß es allein infolge des Wasserverlustes zu einem scheinbaren Anstieg

der Rest-N-Körper im Darm kommen müsse. Um diese lediglich durch Konzentrationsänderung bewirkte Rest-N-Erhöhung von einem durch enzymatischen Abbau der Blutbestandteile entstandenen Rest-N-Zuwachs unterscheiden bzw. rechnerisch in Abzug bringen zu können, war es nötig, das Ausmaß dieser Konzentrationsänderung bzw. der Wasserabgabe möglichst genau kennen zu lernen.

Aus diesem Grunde wurden die in den nachstehenden Versuchen verwendeten Egel vor und nach Nahrungsaufnahme sowie kurz vor der Tötung (zur Gewinnung des Nahrungsblutes) gewogen. 20 Tiere wurden in der vorstehend beschriebenen Weise mit defibriniertem Hammelblut und weitere 20 Tiere mit Chl.-Hammelblut (1:1000) gefüttert. Die Ergebnisse der Wägungen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2. Wasserabgabe durch Egel.

	A	B	C	B-A	t	B-C	C-A	D
Normal-Egel								
1.	2,92	6,87	3,21	3,95	0,5	3,66	0,29	7,34
2.	1,65	5,70	2,46	4,05	1	3,24	0,81	20,00
3.	2,46	5,57	3,18	3,11	2	2,39	0,72	23,15
4.	2,60	4,79	3,31	2,19	3	1,48	0,71	32,42
5.	1,90	4,87	2,97	2,97	5	1,90	1,07	36,02
6.	1,44	4,77	2,81	3,33	6	1,96	1,37	41,11
7.	1,83	5,33	3,27	3,50	7	2,06	1,44	41,14
8.	2,50	4,77	3,42	2,27	8	1,35	0,92	40,53
9.	2,43	5,73	3,85	3,30	10	1,88	1,42	43,03
10.	2,07	6,97	4,15	4,90	12	2,82	2,08	42,45
11.	1,93	6,63	3,85	4,70	14	2,78	1,92	40,08
12.	2,35	6,60	4,26	4,25	16	2,34	1,91	44,90
13.	2,47	6,76	—	4,29	17	—	—	—
14.	1,89	7,01	4,29	5,12	19	2,72	2,40	46,80
15.	1,70	5,06	3,21	3,36	21	1,85	1,51	44,90
16.	1,93	5,72	3,52	3,79	24	2,20	1,59	41,90
17.	2,51	6,06	4,06	3,55	27	2,00	1,55	43,70
18.	1,93	5,59	3,56	3,66	31	2,03	1,63	44,50
19.	2,24	4,94	3,47	2,70	36	1,47	1,23	45,50
20.	2,37	4,02	3,09	1,65	40	0,93	0,72	43,60
	43,12			70,64			25,29	
Chl.-Egel ¹								
1.	1,95	4,78	2,14	2,83	0,5	2,64	0,19	6,71
2.	2,05	5,90	2,42	3,85	1	3,48	0,37	9,61
3.	2,43	5,40	2,96	2,97	2	2,44	0,53	17,84
4.	1,83	4,40	2,44	2,57	3	1,96	0,61	23,73
5.	1,74	5,19	2,56	3,45	5	2,63	0,82	23,77
6.	1,65	4,13	2,40	2,48	6	1,73	0,75	30,24
7.	2,09	5,00	3,01	2,91	7	1,99	0,92	31,61
8.	2,37	6,42	3,50	4,05	8	2,92	1,13	25,43
9.	2,51	6,34	3,61	3,83	10	2,73	1,10	28,72
10.	1,97	4,94	2,65	3,15	12	2,29	0,86	27,30
11.	1,94	4,83	2,84	2,89	14	1,99	0,90	31,14
12.	2,13	6,66	3,51	4,53	16	3,15	1,38	30,46
13.	2,44	7,67	4,06	5,23	17	3,61	1,62	30,97
14.	2,22	7,37	3,83	5,15	19	3,54	1,61	31,26
15.	1,97	4,12	2,64	2,15	21	1,48	0,67	31,16
16.	1,99	4,83	2,88	2,84	24	1,95	0,89	31,33
17.	1,84	4,55	2,65	2,71	27	1,90	0,81	29,89
18.	2,59	7,12	3,87	4,53	31	3,25	1,28	28,27
19.	2,44	7,48	4,01	5,04	36	3,47	1,57	31,15
20.	2,44	6,06	3,61	3,62	40	2,45	1,17	32,32
	42,41			70,78			19,18	

A = Gewicht der Egel; B = Gewicht der Egel nach dem Saugen; C = Gewicht der Egel vor der Rest-N-Messung; B-A = Gewicht des aufgenommenen Blutes; t = Zeit nach der Nahrungsaufnahme in Tagen; B-C = Gewicht des Blutes vor der Rest-N-Messung; C-A = Gewichtsverlust des aufgenommenen Blutes; D = Gewichtsverlust des aufgenommenen Blutes in % = $\frac{C-A}{B-A} \cdot 100$ (alle Gewichtsangaben in g).

¹ Chl.-Egel = mit chloromycetinhaltigem Blut gefütterte Egel.

Aus diesen Messungen geht somit folgendes hervor:

1. Die Menge des aufgenommenen Nahrungsblutes ist in beiden Gruppen gleich hoch (vgl. die Spalten B-A), nämlich insgesamt 70,64 g bzw. 70,78 g. D. h. chloromycetinhaltiges Blut wird von den Egelⁿ ebenso gern angenommen wie Chl.-freies Blut.

2. Die bei den Normalegelⁿ gefundenen Werte für den durch Wasserabgabe erfolgenden Gewichtsverlust stimmen im wesentlichen mit den von PÜTTER angegebenen Werten überein. Die Hauptmenge des Wassers wird innerhalb der ersten 5 Tage ausgeschieden; die Wasserabgabe im Gefolge der Nahrungsaufnahme ist etwa am 10. Tage abgeschlossen. Insgesamt tritt bis zu diesem Zeitpunkt bei normalen Egelⁿ ein Nahrungsgewichtsverlust (Wasser) von rund 41—43% ein. Bei Chl.-Tieren ist diese physiologische Wasserabgabe von Anfang an deutlich behindert und bleibt im Endergebnis um etwa 11—13% hinter der Wasserabscheidung normaler Egel zurück¹. Als schon äußerlich erkennbaren Ausdruck der geringeren Wasserabscheidung bei Chl.-gefütterten Egelⁿ werteten wir auch die Beobachtung, daß bei solchen Tieren das Nahrungsblut stets bedeutend flüssiger blieb als bei normal gefütterten Egelⁿ, bei denen das Blut in kurzer Zeit eine dickflüssige zähe Beschaffenheit annimmt.

Tabelle 3.

	Zeit nach Blutaufnahme in Tagen	Rest-N in mg%	
		Normal-Egel	Chl.-Egel
1.	0,5	28,7	26,0
2.	1	38,0	25,2
3.	2	39,9	26,8
4.	3	46,5	24,0
5.	5	52,7	27,3
6.	6	47,3	27,3
7.	7	45,1	28,0
8.	8	44,9	25,1
9.	10	37,5	25,1
10.	12	34,9	26,1
11.	14	29,8	25,2
12.	16	29,8	23,1
13.	17	—	22,0
14.	19	34,2	24,6
15.	21	28,2	24,0
16.	24	29,7	18,9
17.	27	26,5	26,2
18.	31	29,5	23,6
19.	36	30,1	20,0
20.	40	26,1	20,4

¹ Hiermit findet eine schon von ROUBAUD bei Untersuchungen an Tse-tse-Fliegen ausgesprochene Vermutung, daß nämlich die Wasserabscheidung aus dem Darm bei Blutsaugern an die Tätigkeit von Mikroorganismen geknüpft zu sein scheint, eine allerdings nur analogiemäßige Bestätigung.

Hauptversuch: Rest-N-Messungen.

Tab. 3 zeigt die Ergebnisse der Reststickstoff-Bestimmungen im Nahrungsblut bei je 20 mit chloromycetinhaltigem und chloromycetin-freiem Blut gefütterten Egel.

Aus den Rest-Stickstoff-Messungen können keine unbedingt feststehenden Schlüsse über den Gesamtverlauf der verdauungsphysiologischen Vorgänge beim Blutegel gezogen werden; mit Sicherheit sagen sie nur aus, daß der Verdauungsvorgang beim Blutegel anders gestaltet wird, wenn ihm die darmbewohnenden Bakterien entzogen werden. Die Beobachtung der gemessenen Rest-N-Werte zeigt, daß der Unterschied in der Rest-N-Körper-Produktion zwischen Normalegel und Chl.-Egel am größten ist von der Zeit der Nahrungsaufnahme an bis etwa zum 14. Tage danach. Bemerkt sei zu den Vergleichen noch, daß jede Messung den Rest-N-Wert eines einzelnen Egels wiedergibt, der, weil er bei der Blutentnahme getötet werden mußte, zu weiteren Messungen nicht verwendet werden kann. Daß man trotzdem die Summe der Einzelmessungen zur Betrachtung des Gesamtablaufes verwenden darf, zeigt die Lage der Meßpunkte: die Abweichung von einer Durchschnittskurve, die aus den Meßpunkten konstruiert werden kann, ist in dem beobachteten Zeitraum sehr gering.

Der starke Anstieg der Rest-N-Werte nach dem Saugen erfolgt nur beim Egel, der die darmbewohnenden Bakterien beherbergt, nicht aber bei Egel, denen *Ps. hirudinis* durch Chl.-Zusatz zum Nahrungsblut entzogen wurde. Darin wird man wichtige physiologische Beziehungen zwischen den beiden Partnern sehen dürfen, zumal *Ps. hirudinis* regelmäßig im deutschen und im ungarischen Egel nachgewiesen wurde.

Daß dieser anfänglich starke Anstieg der Rest-N-Werte tatsächlich durch die Bakterien bedingt ist, zeigt außerdem ein Vergleich mit den in vitro gemessenen Rest-N-Werten von Blut, das mit *Ps. hirudinis* beimpft war. Dort lagen alle Punkte der Messungen in einem Zeitraum von 68 Tagen auf einer ansteigenden Kurve. Vergleicht man nun die Messungen in vitro mit denen von Normalegeln, indem man die Gewichtsabnahme der Egel als Korrektur der Normalegel-Messungen benutzt, so verlaufen beide Kurven in der Zeit nach der Nahrungsaufnahme auffallend nahe zusammen. Durch die Wasserabgabe nach dem Saugen kommt, wie beschrieben, eine Erhöhung der Konzentration der im Blut gelösten Substanzen zustande, die bei der jeweiligen Messung auch die Rest-N-Körper-Konzentration höher erscheinen läßt, als sie ohne die Wasserabgabe wäre. Legen wir deshalb die aufgenommene Blutmenge (also ohne Wasserverlust) für den gemessenen Rest-N-Wert zugrunde und rechnen danach die theoretischen Rest-N-Werte aus, so ergeben sich die in Tab. 4 wiedergegebenen Werte:

Tabelle 4. Rest-N-Werte des Blutes nach „Wasserkorrektur“.

Auf- genommenes Blut	Blut minus abgegebenes Wasser g	Gemessener Rest-N in vivo mg%	Theoretischer Rest-N nach „Wasserkorrektur“ mg%	Gemessener Rest-N in vitro mg%	Zeit (Tage) nach Blut- aufnahme
B-A	B-C	Rest-N	$\frac{B-C}{B-A}$	Rest-N	
Normalegel					
				(beimpft mit <i>Ps. hirudinis</i>)	
3,95	3,66	28,7	26,6	—	0,5
4,05	3,24	38,0	30,4	29,1	1
3,11	2,39	39,9	30,7	32,6	2
2,19	1,48	46,5	31,1	30,9	3
2,97	1,90	52,7	33,7	33,6	5
Chl.-Egel					
				(unbeimpft)	
2,83	2,64	26,0	24,2	—	0,5
3,85	3,48	25,2	22,8	24,0	1
2,97	2,44	26,8	22,0	23,0	2
2,57	1,96	24,0	18,3	24,5	3
3,45	2,63	27,3	20,0	25,2	5

Erklärung der Abkürzungen siehe Abb. 5 und 6.

Bei Normalegeln steigen die korrigierten Werte in 5 Tagen von 25,8 mg% (= Ausgangswert des Blutes) auf 33,7 mg%. Die in vitro gemessenen Rest-N-Werte in vitro nehmen in der gleichen Zeit von 25,8 bis 33,6 mg% zu (vgl. C mit D in Abb. 5). Diese Übereinstimmung weist darauf hin, daß die Rest-N-Körper-Produktion im Darm der Blutegel tatsächlich durch *Ps. hirudinis* ausgeführt wird.

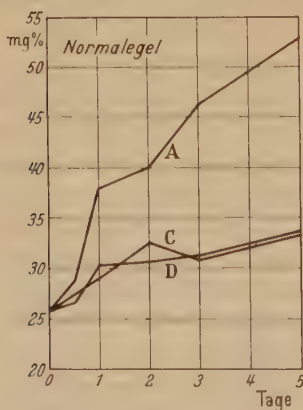


Abb. 5.

Abb. 5. Rest-N-Werte des Blutes nach „Wasserkorrektur“; Normalegel. A in vivo gemessene Werte; B in vitro gemessene Werte; C in vitro gemessene Werte; D theoretische Werte nach „Wasserkorrektur“.

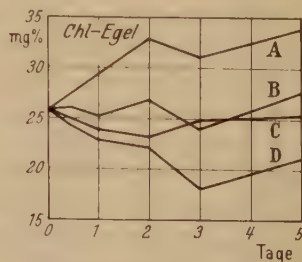


Abb. 6.

Abb. 6. Rest-N-Werte des Blutes nach „Wasserkorrektur“; Chl.-Egel. A in vivo gemessene Werte; B in vitro gemessene Werte; C in vitro gemessene Werte; D theoretische Werte nach „Wasserkorrektur“, in vitro.

Bei Chl.-Egeln (Abb. 6) nähern sich die Rest-N-Werte des Nahrungsblutes (B) den in-vitro-Werten von unbeimpftem Blut (C), ebenso die theoretischen Werte (D). Es ist außerdem wichtig festzustellen, daß die Korrekturwerte bedeutend niedriger liegen als in den in-vitro-Werten von mit *Ps. hirudinis* beimpftem Blut. Das heißt: die Produktion der Rest-N-Körper erfolgt durch *Ps. hirudinis*; bei keimfrei gemachtem Darm wird die Bildung von Rest-N-Substanzen gestoppt. Unter Berücksichtigung der Wasserkorrektur (Kurve D) zeigt sich, daß lediglich die primär vorhandenen Rest-N-Körper des Nahrungsblutes resorbiert werden, aber keine Neubildung derselben aus Eiweiß erfolgt. Bei Normalegeln kommt es etwa vom 10. Tage nach der Nahrungsaufnahme ab anscheinend zur Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen Resorption und Nachlieferung der Rest-N-Körper, die eine über längere Zeiträume sich erstreckende Belieferung des Wirtes durch seinen Symbionten mit Eiweißabbauprodukten gewährleistet.

c) Antibiotische Fähigkeiten von *Ps. hirudinis*.

Die in Anbetracht des überaus bakterienreichen Biotops des Blutegels auffallende Tatsache, daß die Darmflora normaler Blutegel nur aus einer einzigen Keimart (*Ps. hirudinis*) besteht, legte schon zu Beginn unserer Untersuchungen (BÜSING 1951) die Vermutung nahe, daß dieses Bakterium über irgendwelche antibiotische Fähigkeiten verfügen müßte, die das Aufkommen einer Mischflora oder gar eine Verdrängung des Symbionten verhindert.

Die Frage, ob Fremdkeime, insbesondere pathogene Bakterien, sich im Blutegeldarm zu halten vermögen, hat u. a. schon STEFFENHAGEN u. ANDREJEW sowie MÜHLING interessiert. Sie verfütterten künstlich infizierte Blutproben an Blutegel. Der Nachweis der aufgenommenen Fremdkeime gelang ihnen nur kurze Zeit nach der Nahrungsaufnahme. Nach mehr oder weniger langer Zeit waren jedoch die künstlich zugeführten Bakterien aus dem Darmtrakt verschwunden. Diese im Hinblick auf die medizinische Anwendung von Blutegeln bedeutsame Frage, ob nämlich etwa von einem früheren Saugakt an infektionskranken Menschen herührende pathogene Bakterien bei eventuell späterer Wiederverwendung desselben Blutegels zu einer Infektion führen könnte, wird von diesen und anderen Autoren übereinstimmend verneint.

Man hat diese Erscheinung mit einer angeblichen „desinfizierenden Wirkung des Hirudins“ (s. z. B. bei HERTER) zu erklären versucht, ohne jedoch irgendwelche Experimente hierüber angestellt zu haben. Obwohl wir dieser Behauptung wenig Wahrscheinlichkeit beimaßen, prüften wir offizinell aus Egelköpfen gewonnenes Hirudin gegenüber verschiedenen Keimarten; eine bactericide bzw. bakteriostatische Wirkung des Hirudins konnten wir jedoch nicht nachweisen. Auch Blutegel-Trockensubstanz (bei 50° C getrocknete und anschließend pulverisierte Blutegel) zeigte nach Beimengung zu Nährböden keinerlei Hemmwirkung gegenüber

Staphylokokken. Herauspräparierte, getrocknete und pulverisierte Egel-därme ließen ebenfalls jegliche antibiotische Wirksamkeit vermissen.

Die von DINAND u. BOTTENBERG, SCHWEIZER sowie WEILER aufgestellten Behauptungen über die Existenz eines stark antibiotischen Blutegelsymbionten „*Bacillus hirudinis*“, der für „Reinhaltung der Egeloberfläche“ und gegebenenfalls auch des Darmtraktes von Fremdkeimen verantwortlich sein sollte, müssen wir auf Grund unserer Untersuchungen ablehnen. Von diesem *Bacillus* wird in einem späteren Abschnitt noch ausführlicher die Rede sein.

Dagegen schien es uns auf Grund unserer bisherigen Befunde aussichtsreich zu sein, den obligaten und alleinigen bakteriellen Darmsymbionten des Blutegels, *Ps. hirudinis*, einer Prüfung auf antibiotische Fähigkeiten zu unterziehen. Wir können das Ergebnis dieser mit allen gebräuchlichen Methoden zum Nachweis antibiotischer Substanzen angestellten Versuche dahin zusammenfassen, daß es uns zunächst nicht gelang, irgendwelche antibiotischen Eigenschaften nachzuweisen. (Angewandte Methoden: Prüfung der Bouillonkultur-Filtrate von *Ps. hirudinis* im Röhrchentest, Gußplattenverfahren, Filtrierpapier-Plattentest, Loch- und Zylindertest u. a.; geprüfte Testkeime: *C. diphtheriae*, *Sh. dysenteriae*, *Kl. ozaenae*, *Staph. aureus*.) Erst als wir dazu übergingen, *Ps. hirudinis* zusammen mit Testkeimen (z. B. *Staph. aureus*) in defibriniertem Blut zu züchten, erhielten wir positive Ergebnisse: Die miteingesäten Staphylokokken entwickelten sich neben *Ps. hirudinis* sehr schlecht und nahmen im Laufe mehrtägiger Bebrütung bei 37° C zahlenmäßig immer mehr ab, bis sie nach 11 Tagen in den mikroskopisch kontrollierten Ausstrichpräparaten überhaupt nicht mehr nachweisbar waren; gleichzeitige Ausstriche auf Agarnährböden bestätigten die fortschreitende Abnahme der Staphylokokken in der Mischkultur, während sie sich in einem Kontrollansatz (Blut nur mit Staphylokokken beimpft) ungehindert vermehrten. Ein völlig gleichsinniges Ergebnis wurde mit Nahrungsblutproben, die aus gefütterten Egelu gewonnen wurden, erhalten: Eingesäte Staphylokokken waren nach etwa 14 Tagen Verweilen mikroskopisch nicht mehr nachweisbar.

Diese Versuchsergebnisse stellen somit zunächst eine Bestätigung der schon seit langem bekannten Tatsache dar (MÜHLING, STEFFENHAGEN u. ANDREJEW, WEILER), daß Fremdkeime im Blutegeldarm nach einiger Zeit zugrunde gehen, und darüber hinaus, daß *Ps. hirudinis* die Ursache dieser Keimvernichtung ist.

d) Fettspaltung durch *Ps. hirudinis*.

An höher molekularen Substanzen sind im Blut außer Eiweiß auch Fette und Lipoide in beachtenswerter Menge enthalten (z. B. Menschenblut: Gesamtfette = 500–800 mg%; Phosphatide (Lecithin) = 160–300 mg%; Cholesterin = 140 bis 200 mg%). Die Frage nach der Hydrolysierung dieser Nahrungsbestandteile glauben

AUTRUM u. GRAETZ durch den Nachweis lipatischer Fermente im Blutegeldarm gelöst zu haben. Sie fanden einmal im Darminhalt ein lipatisch wirksames Enzym und zum andern in zerriebenen Darmwandzellen eine zweite Lipase.

Es erhebt sich jedoch im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen die Frage: Handelt es sich bei einer oder gar beiden Lipasen, die von diesen Autoren nachgewiesen wurden, tatsächlich um echte Sekretionsenzyme?

Was zunächst die „Darm-lumenlipase“ anlangt, so muß es nach der von AUTRUM u. GRAETZ angewandten Technik durchaus zweifelhaft bleiben, ob sie vom Blutegel selbst, d. h. also von exkretorischen Organen oder Zellen der Darmwand gebildet und sezerniert wird. Es besteht vielmehr die Möglichkeit, daß diese Lipase bakterieller Herkunft ist. Wir werden in den nachstehenden Versuchen zeigen, daß *Ps. hirudinis* über eine kräftige Lipase verfügt; hierdurch wird die Herkunft der von AUTRUM u. GRAETZ nachgewiesenen Darm-lumenlipasen zumindest zweifelhaft. Der von den gleichen Autoren geführte Nachweis einer Lipase, die aus zerriebenen Darmwandzellen gewonnen wurde, ist unseres Erachtens für die vorliegende Fragestellung (eigene Sekretions-Lipasen) ohne Belang, da es sich bei dieser Lipase um ein intracelluläres Enzym handelt, welches offenbar die Funktion der Resynthese der im Darm gespaltenen Fett- bzw. Lipoid-Bruckstücke hat.

Die Fähigkeit zur Fettspaltung und Fettspeicherung ist in der Bakterienwelt weit verbreitet. Insbesondere ist diese Eigenschaft bei *Pseudomonas*-Arten nicht selten. Zur Prüfung des Fettspaltungsvermögens von *Ps. hirudinis* wurden daher folgende Untersuchungen angestellt:

1. Verwertung von Tributyrin als einzige C-Quelle durch *Ps. hirudinis*.

Ps. hirudinis wurde in eine Nährlösung folgender Zusammensetzung eingimpft: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1,0 g; KCl 0,2 g; MgSO_4 0,2 g; Aq. dest. ad 1000,0 g. Zu 10 ml dieser Lösung wurden 5 Tropfen gereinigtes Tributyrin (WILLSTÄTTER u. MEMMEN) gegeben, das Gemisch 30 min auf der Schüttelmaschine kräftig geschüttelt, vom Ungelösten abgossen, die Wasserstoffionenkonzentration auf pH 7,2 eingestellt und diese Nährlösung schließlich im Autoklaven sterilisiert.

Nach 24stündiger Bebrütung bei 37° C ist deutliches Wachstum festzustellen; d. h. *Ps. hirudinis* hydrolysiert Tributyrin und verwertet die Bruchstücke, wahrscheinlich zuerst das Glycerin als Energie- und Kohlenstoffquelle.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei Angebot von Olivenöl, Mohnöl und Rüböl gemacht. *Ps. hirudinis* wächst auf Nähragarplatten mit Zusatz von einem Tropfen der betreffenden Öle zunächst (1—2 Tage) ohne erkennbare Veränderungen der auf der Oberfläche der Platte fein verteilten Öltröpfchen; nach 4—5 Tagen jedoch wachsen die Keime unter Krustenbildung (Fettsäureabscheidung) in die Öltröpfchen hinein. Dabei tritt ein charakteristischer Geruch nach Aprikosen auf.

2. Stalagmometrische Messung der Tributyrin-Spaltung durch *Ps. hirudinis*.

Das käufliche Tributyrin wird sorgfältig gereinigt (WILLSTÄTTER u. MEMMEN), davon 10 Tropfen zu 1 Liter Aqua dest. gegeben und 2 Std auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Nach 24 Std wird durch ein feuchtes Faltenfilter und Verwerfung der

ersten ml filtriert. Von dieser Tributyrin-Lösung werden 0,8 ml in 2,0 ml *Ps. hirudinis*-Aufschwemmung in Phosphatpuffer (pH 7,2) gegeben und stalagmometrisch die Tropfenzahlabnahme je Zeiteinheit gemessen. Abb. 7 zeigt die Eichkurve des Stalagmometers nach FRANKE: Messung einer Verdünnungsreihe der oben angegebenen Tributyrin-Lösungen.

Abb. 8 zeigt die Messungen des Versuchsansatzes. Die Tropfenzahl nimmt somit in einer Stunde von 98,1 auf 86,2 Tropfen ab; dies entspricht (s. Eichkurve, Abb. 7) einer Konzentrationserniedrigung des Tributyrins von 100% auf 30%. D. h. 70% des Tributyrins werden innerhalb einer Stunde durch *Ps. hirudinis* gespalten.

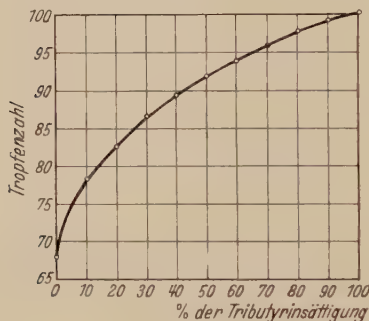


Abb. 7.

Abb. 7. Eichkurve zur Tributyrinspaltung.

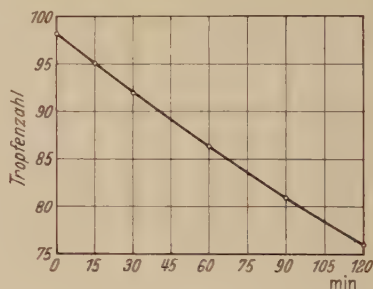


Abb. 8.

Abb. 8. Zeitlicher Verlauf der Tributyrinspaltung durch *Ps. hirudinis*.

Durch diese Versuche ist die Fähigkeit von *Ps. hirudinis*, höher- und niedermolekulare Ester zu spalten, erwiesen. Auf Grund dieser Befunde glauben wir, zu der Ansicht berechtigt zu sein, die „Darmlipase“ des Blutegels für ein Bakterienenzym zu halten.

e) Die Übertragung von *Ps. hirudinis* vom Elterntier auf den Jung-Egel.

Das regelmäßige Vorkommen von *Ps. hirudinis* im Darm aller von uns untersuchten Blutegel veranlaßte uns, nach einem möglichen festen Übertragungsmechanismus dieses Symbionten vom Elterntier auf den Jung-Egel zu forschen. Bei Bakteriensymbiosen sind Übertragungseinrichtungen durch Infektion der Eioberfläche durch Ovarial- oder Embryonalinfektion bekannt (Lit. bei DÖLL). Dies veranlaßte uns, zunächst in den Geschlechtsorganen und deren Ausführungsgängen nach *Ps. hirudinis* zu suchen. Hierzu wurden Egel unter möglichst sterilen Bedingungen von der Ventralseite aus aufpräpariert und folgende Organe entnommen: Penis mit Prostata, Samenblase, Hoden und die weiblichen Geschlechtsorgane. Bei der bakteriologischen Untersuchung dieser Organe ließ sich niemals *Ps. hirudinis* nachweisen. Eine Übertragung durch Infektion der Eier bzw. der Eioberfläche ließ sich infolgedessen mit hinreichender Wahrscheinlichkeit ausschließen.

Dagegen gelang es uns, nach dem Vorgang von JASCHKE, der die Übertragung von Darmbakterien über die Kokonflüssigkeit bei *Piscicola geometra* (Fischegel) beschrieben hat, diesen Übertragungsmechanismus auch für Egel der Gattung *Hirudo* nachzuweisen.

Obwohl die Zucht von *Hirudo officinalis* und *H. medicinalis* im Aquarium bekanntlich als sehr schwierig angesehen wird, konnten wir in einem mit 9 gut ernährten Egeln (*H. officin.*) besetzten Aquarium, welches eine über den Wasserspiegel herausragende, mit Uferpflanzen besetzte Uferböschung (sandhaltiger Lehm) besaß, nach einigen Wochen in frisch angelegten Bohrhöhlen die Ablage von drei Kokons beobachten.

Die bakteriologische Untersuchung der Kokonflüssigkeit, die durch Punktion mit steriler Spritze gewonnen wurde, ergab das Vorhandensein von 4 verschiedenen Bakterienarten, unter ihnen *Ps. hirudinis*. Bei der Untersuchung des Darminhaltes der im Kokon befindlichen Jung-Egel fand sich ebenfalls *Ps. hirudinis* neben einigen anderen Bakterien der *Pseudomonas*- und *Alcaligenes*-Gruppe. Nach etwa 2 Monaten wurden die aus den Kokons gewonnenen Jung-Egel erstmalig mit sterilem Hammelblut gefüttert und 12 Tage nach dieser Mahlzeit getötet. Die Untersuchung des Darminhaltes ergab in Übereinstimmung mit den im vorigen Abschnitt erwähnten antibiotischen Fähigkeiten jetzt nur noch das Vorhandensein einer Keimart: *Ps. hirudinis*.

In welchem Stadium der Kokonbildung bzw. Kokonabstreifung erfolgt jedoch die Infektion der Kokonflüssigkeit mit *Ps. hirudinis*? Da die Geschlechtsorgane, die Geschlechtswege sowie die Körperoberfläche der Egel (s. Abschn. IV) normalerweise nicht mit *Ps. hirudinis* besiedelt sind, war eigentlich nur eine Infektion der Kokonflüssigkeit beim Abstreifen über den Kopf aus der Schlundöffnung heraus denkbar. Es mußte daher geprüft werden, ob *Ps. hirudinis* sich regelmäßig auch in der Schlundregion bzw. der Schlundöffnung nachweisen läßt. Hierzu wurden an 20 Egeln mit steriler Platinöse Schlundabstriche gemacht und auf Blutagar ausgestrichen. 20 weitere Egel ließen wir kurz an Blutagarplatten saugen. Ausstriche und „Saugplatten“ wurden 24 Std bei 37° C bebrütet. Ergebnis: In 18 Schlundausstrichen und an 11 Saugstellen ließ sich *Ps. hirudinis* (z. T. in Reinkultur) nachweisen.

Die Übertragung der *Ps. hirudinis* vom Elterntier auf den Jung-Egel ist somit anscheinend durch einen festen Übertragungsmechanismus gewährleistet. Der im Bereich der Clitellarregion bandförmig um den Blutegelkörper abgeschiedene Kokon, in welchen die Eier aus den Ausführgängen der Geschlechtswege abgelegt werden, wird über den ganzen Egelkörper nach vorn und schließlich über den Kopf abgestreift. Dabei infiziert sich die Kokonflüssigkeit mit Keimen der Egeloberfläche und im Bereich des Schlundes schließlich auch mit *Ps. hirudinis*. Die Keime gelangen durch die Schlundöffnung der Jung-Egel in den Darmtrakt,

in welchem sich schließlich (spätestens nach der ersten Blutmahlzeit) *Ps. hirudinis* mit Hilfe seiner antibiotischen Eigenschaften als alleiniger Bewohner durchsetzt.

Zusammenfassung der Ergebnisse über die Untersuchungen der Darmflora von *Hirudinis officinalis* und *H. medicinalis*.

1. Der Darmtrakt von Blutegeln (*Hirudo*) ist mit einem Symbionten: *Pseudomonas hirudinis* besiedelt.

2. *Ps. hirudinis* hämolysiert *in vitro* wie *in vivo* die Erythrocyten und spaltet Eiweiß und Fette. Er gewährleistet auch die nach Nahrungsaufnahme erfolgende physiologische Wasserabscheidung (Eindickung des Nahrungsblutes) bei Blutegeln.

3. Das Symbioseverhältnis besteht darin, daß der Wirt (*Hirudo*) seinem Symbionten (*Ps. hirudinis*) einen Teil seiner Nahrung zur Verfügung stellt und der Symbiont die Aufschließung der hochmolekularen Nährstoffe (Eiweiß, Fette) im Darm übernimmt. Erst hierdurch ist der Wirt in der Lage, die in den Darm aufgenommene Nahrung zu resorbieren, da er über keine darmeigenen Sekretionsenzyme (Hydrolasen) verfügt.

4. Die Übertragung des Symbionten vom Elterntier auf den Jung-Egel ist durch einen festen Übertragungsmechanismus gesichert („cyclische Symbiose“).

IV. Die Nephridial-Flora.

Über die allgemeine Anatomie der Segmentalorgane des Blutegels vgl. den einleitenden Abschn. I. Von den einzelnen Teilen des Nephridialorgans interessierte uns vor allem der erwähnte „Flimmerbesatz“ der Endblase sowie eine etwa vorhandene bakterielle Besiedlung der Harnblasenflüssigkeit.

a) Der „Flimmerbesatz“ des Harnblasenepithels.

Die Vorstellungen über den Austreibungsmechanismus des sich in der Harnblase ansammelnden Harns weichen in verschiedener Hinsicht voneinander ab. Während BOLSUS meint, daß die Entleerung durch den Druck der anliegenden Organe, d. h. also durch den mit Nahrungsblut gefüllten Darm, erfolgt, zeigten LEUCKART u. BRANDES, daß die Endblase einen circulären Muskelmantel besitzt, der durch Kontraktion den Harn austreibt. Merkwürdigerweise halten es viele Untersucher (BOURNE, GRAF, SCRIBAN u. AUTRUM) für notwendig, der Blase außerdem noch ein Flimmerepithel zuzuschreiben; diese Angabe hat sich auch bis jetzt in den modernen Handbüchern der Zoologie anscheinend durchgesetzt (s. z. B. bei HERTER), obwohl schon LEUCKART u. BRANDES sowie später BUCHNER sowie JASCHKE auf die mögliche „Leptothrix“-Natur der fädigen Gebilde, welche dem Blaseninnern aufsitzen, hingewiesen haben. Eine ausführlichere Darstellung diesbezüglicher Literaturstellen findet sich bei FREYTAG.

1. Eigene histologische Beobachtungen.

Von frisch herauspräparierten Egel-Harnblasen wurden Gefrierschnitte angelegt, die mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN gefärbt wurden. Man erkennt den dichten Besatz teils parallel gerichteter, teils auch verfilzter Fäden, die in dieser Abbildung größtenteils ziemlich gleichmäßig dem Harnblasenepithel aufsitzen. An einigen Stellen sind Körnelungen, besonders am apikalen Ende, festzustellen, ein Befund, der

mit der absoluten Homogenität echter Cilien kaum in Einklang zu bringen ist. Auffällig und ebenfalls gegen die Ciliennatur sprechend ist der starke Längenunterschied der einzelnen Fäden. Am rechten oberen Bildrand scheint sich der Besatz in toto abgelöst zu haben und flottiert frei im Lumen. Dies zeigt Abb. 10 noch deutlicher.

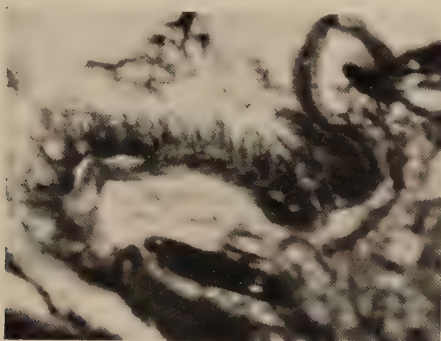


Abb. 9. „Flimmerbesatz“ des Harnblasenepithels beim Blutegel. Vergr. 500fach.

Man kann die Abhebung oder Ablösung des Besatzes an frischen, unfixierten und ungefärbten Präparaten durch leichtesten Druck auf das Deckglas, z. B. durch die Frontlinse starker Objektive, leicht hervorrufen und z. B. im Phasenkontrast-Mikroskop unmittelbar beobachten.

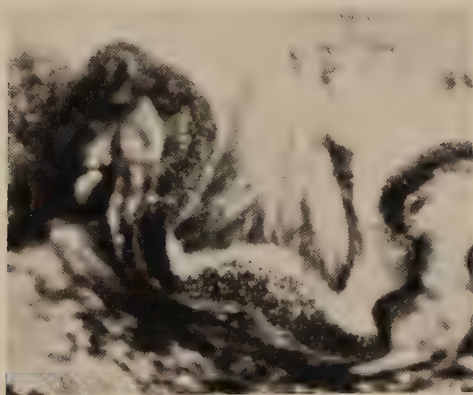


Abb. 10. „Flimmerbesatz“ (abgelöst) des Harnblasenepithels beim Blutegel. Vergr. 500fach.

Hierbei fällt vor allem auch die absolute Starrheit dieser Fäden auf. Ein „Cilienschlag“ war auch bei lebensfrischen Präparaten niemals zu beobachten.

Infolge der leichten Ablösbarkeit des Fadenbesatzes findet man Konglomerate verfilzter Fäden häufig auch frei in der Harnblasenflüssigkeit (Abb. 11). Sie zeigen — im Gegensatz zu den Angaben von LEUCKART u.

JASCHKE — keine aktive Beweglichkeit, sondern höchstens eine träge Molekularbewegung. Die Fadenkonglomerate sind schon mit bloßem Auge oder bei Lupenvergrößerung als weißliche Flöckchen in der Harnblasenflüssigkeit zu erkennen. Im mikroskopischen Bilde zeigen sie charakteristischerweise eine strahlige oder drusenförmige Lagerung der einzelnen Fäden.

BOURNE hielt diese „weißlichen Massen“ für Fibringerinnsel, MARCHAL verglich sie mit Leucin-Kristallen; er erwähnt jedoch, daß sie in Wasser, Ammoniak oder verdünnter Salpetersäure unlöslich seien. GRAF erkannte schon die eigenartigen Körnelungen, hielt sie aber für Niederschläge, die durch die Fixierung entstanden seien.

Eine Untersuchung der Fäden auf ihr optisches Verhalten zwischen gekreuzten Nicols ergab optische Isotropie. Auch dieser Befund spricht

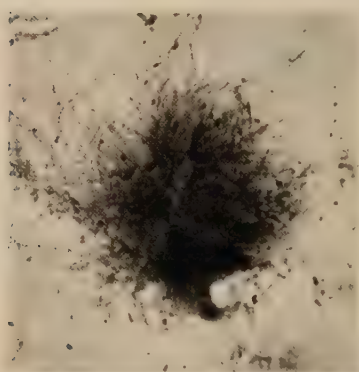


Abb. 11. Verfilzte Fäden in der Harnblasenflüssigkeit des Blutegels. Vergr. 600fach.

gegen die Ciliennatur des Fadenbesatzes. Cilien sind optisch stets völlig homogene Gebilde und zeigen im polarisierten Licht positive Doppelbrechung in Bezug auf ihre Länge (GURWITSCH, WEISS, BUCHTHAL und KNAPPEIS). Auf Grund der vorgelegten Befunde hielten wir die Annahme für berechtigt, daß es sich bei diesem regelmäßig vorkommenden Fadenbesatz der Egel-Harnblase um Bakterien handeln müsse. Um diese schon von LEUCKART und BRANDES sowie von JASCHKE und von BUCHNER ausgesprochene Ansicht zu begründen, hiel-

ten wir es für notwendig, diese Keime einer eingehenderen bakteriologischen Untersuchung zu unterziehen.

2. Bakteriologische Untersuchungen.

Wir müssen diesem Abschnitt folgende Bemerkung von SCHWARTZ voranstellen: „Symbiont und Wirtsorganismus haben als gemeinsames Merkmal weitgehende Anpassung an ihr Milieu, die im allgemeinen bei dem Symbionten am stärksten zu sein scheint. Züchtung auf künstlichem Substrat gelingt deshalb entweder überhaupt nicht oder nur unter großen Schwierigkeiten.“

Wenn auch die Unmöglichkeit bzw. Schwierigkeit der Züchtung keineswegs für alle Symbionten (z. B. nicht für *Ps. hirudinis*) gelten, so treffen sie doch leider für diesen fädigen Nephridialkeim zu, d. h. er ist nur sehr schwer auf künstlichen Nährsubstraten zur Vermehrung zu bringen. Auf gewöhnlichen Nährmedien wie neutrale oder natursaurer Bouillon

bzw. Agar wuchs er zunächst ebenso wenig wie auf zucker- und bluthaltigen Nährböden. Auch die Züchtung bei verschiedener Temperatur (18° , 22° , 36°) und veränderter Wasserstoffionenkonzentration (pH 6,5 bis 8,0) mißlang. Dagegen gelang es uns schließlich, den Keim auf sogen. Pilzagar (Agar mit natursaurer Bouillon, $pH = 6,4$, 1% Pepton, 0,5% Kochsalz, 2% Dextrose, 4% Maltose) bei $22^{\circ} C$ zum Wachstum zu bringen. Von dieser Erstkultur aus konnte der Keim später auch auf anderen Nährböden (s. u.) mühelos fortgezüchtet werden. Später gelang uns jedoch die Neuzüchtung dieses Keimes aus dem Egelharn nie wieder. Welche zufälligen, günstigen Faktoren uns diese einmalige Erstzüchtung ermöglichte, können wir trotz eingehender Nachprüfung der seinerzeit angewandten Methodik nicht angeben. Die so gewonnene Reinkultur zeigte folgende kulturmorphologische und biochemische Eigenschaften:

Auf Pilzagar: erscheinen nach zweitägiger Bebrütung 1—2 mm im Durchmesser messende runde, erhabene, glattrandige und feuchtglänzende Kolonien. Die Konsistenz ist anfangs zähschleimig, so daß eine solche Kolonie sich in toto auf dem Agar verschieben läßt. Später haftet sie fester an und nimmt eine zähgallertige Beschaffenheit an. Die Farbe der Kolonien ist rosa bis rostrot; das wasserlösliche Pigment diffundiert in den Nährboden. — Auf Dextrose-Agar:

In fast allen Punkten wie auf Pilz-Agar; jedoch etwas schwächere Pigmentbildung. — Auf Blut-Agar: Die Kolonien erscheinen hier mit mattglänzender Oberfläche. Keine Anheftung der Kolonien an den Nährboden. Kolonien deutlich kleiner als auf Pilz-Agar bzw. Dextrose-Agar. Keine oder nur schwache β -Hämolyse. — Neutraler Nähragar: Wie auf Pilz- oder Dextrose-Agar. Kolonien weniger üppig. — Gelatine: Kolonien wie auf Pilz-Agar; das Pigment ist hier mehr orange-rot. Keine Verflüssigung der Gelatine. — Auf LÖFFLER-Serum ($\frac{2}{3}$ Rinderserum + $\frac{1}{3}$ 2%ige Dextrose-Bouillon bei etwa 80° erstarren lassen): Feuchtglänzende Kolonien, ähnlich wie auf Pilz-Agar, mit mehr orange-gelbem Pigment. Auch hier beim Älterwerden der Kultur Konsistenzänderung von schleimig zu zäh-fadenziehend bis gallertartig (etwa nach 5 Tagen).

Die mikroskopisch-morphologischen Merkmale des auf verschiedenen Nährmedien gezüchteten Nephridial-Keimes sind folgende:

Von Pilzagar: Schlanke, $0,3 \mu$ breite, unbewegliche Fäden von etwa 10μ Länge. — Grampositiv bis gramlabil. Nach 5—10 sec langer Färbung mit wäßriger Fuchsinlösung deutliche Querbänderung. Keine Säurefestigkeit nach ZIEHL-NEELSEN-Färbung. Nach NEISSER-Färbung meist reichlich eingelagerte Volutinkörnchen erkennbar (Abb. 12).

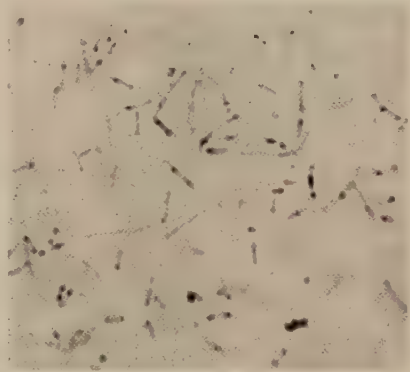


Abb. 12. *C. vesiculare*. 4 Tage alte Kultur.
Vergr. 1000 fach.

In älteren Kulturen, nach etwa 5 Tagen, entwickeln sich nach Verschwinden der Volutinkörnchen in den Fäden nicht anfärbbare Auftreibungen, die Ähnlichkeit mit Bakteriensporen haben (Abb. 13). Sie zeigen aber weder die für Sporen charakteristische Lichtbrechung noch erweisen sie sich als hitzeresistent. Die Tatsache, daß diese Gebilde erst zu einer Zeit beobachtet werden, wenn die Volutinkörnchen verschwunden sind, legt die Vermutung nahe, daß es sich um die leeren Lager der aufgezehrten Volutinkörner handeln könne. Eine endgültige Entscheidung über die Natur dieser Gebilde können wir jedoch nicht geben.

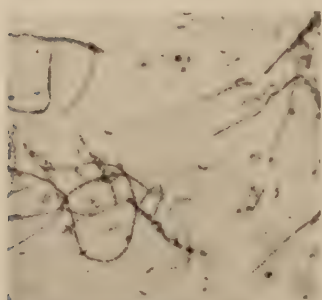


Abb. 13. *C. vesiculare*, 10 Tage alte Kultur, Vergr. 1000fach.

Auf Harnstoff-Dextrose-Agar (0,5% Dextrose, 1% Harnstoff) bilden sich zunächst gleichfalls schlanke Stäbchen von 6–10 μ Länge, die später (nach 6 Tagen) zu langen gewundenen Fäden von etwa 0,5 μ Breite auswachsen (Abb. 14).

Ein merkwürdiges Phänomen läßt sich bei der Gramfärbung dieses Keimes beobachten, wobei es gleichgültig ist, ob man das Präparat von jüngeren oder älteren Kulturen gewinnt: Es kommt nämlich unter der Gramfärbung zu einer bizarren Auftreibung sowohl einzelner Stäbchen als auch längerer Fadenstücke (Abb. 15).

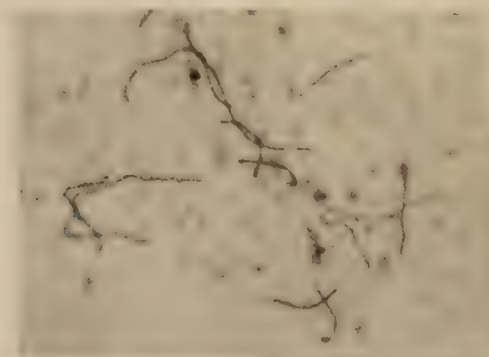


Abb. 14. *C. vesiculare*, Fadenbildung auf Harnstoff-Dextrose-Agar, Vergr. 1000fach.

So entstehen z. B. plumpe, spindelförmige Gebilde aus den ursprünglich schlanken Einzelindividuen oder in Fäden beträchtlich aufgequollene Fadenstrecken. Untersuchungen über die Ursache dieser Deformierung ergaben, daß Carbol-Gentianaviolett zunächst schwach quellend wirkt, aber erst die nachfolgende Lugol-Imprägnation die rapide Auftreibung hervorruft; Lugol'sche Lösung allein wirkt dagegen nicht

quellend. Auch die Hitze-Fixierung und Alkoholbehandlung bei der Gramfärbung hat keinen quellenden Einfluß.

Auf Grund des morphologischen Vergleichs des auf künstlichen Nährböden gezüchteten Keimes mit dem „Cilienbesatz“ der Egelharnblase glauben wir mit Sicherheit aussagen zu können, daß es sich bei dem gefundenen Keim um das Bakterium handelt, welches in der Harnblase als dichter Bakterienrasen angetroffen wird. — Der einmal auf Pilzagar gewachsene Keim läßt sich in den nachfolgend aufgeführten Nährmedien ziemlich gut fortzüchten. Schwierigkeiten bereitet nur die Erstzüchtung aus der Egelharnblase, die uns, wie gesagt, durch einen nicht näher bekannten Zufall auch nur einmal gelang¹.

Von weiteren biochemischen Eigenschaften wurden folgende festgestellt:

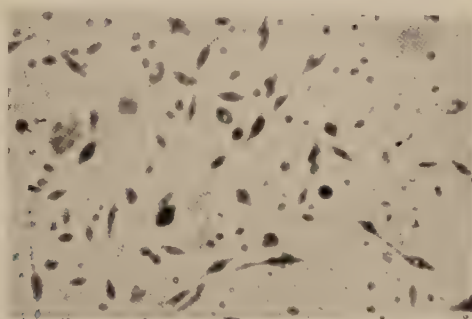


Abb. 15. *C. vesiculare* nach Gram-Färbung. Vergr. 1000fach.

Wachstumsoptimum: Temp. von 22—37° C, pH 6,4; aerob. — Farbstoffbildung: am besten unter aeroben Bedingungen bei 22° C und Belichtung mit diffusum Tageslicht auf Pilzagar (s. o.); auf gew. Nähragar oder Dextroseagar ist die Farbstoffbildung schwächer; auf Nährgelatine erscheint der Farbstoff intensiv orange-rot. — Lakmusmilch: auch bei mehrtägiger Bebrütung bis zu 8 Tagen keine Gerinnung, keine Säuerung, keine Peptonisierung, keine Lakmusreduktion; leichte Alkalisierung. — Trypsinbouillon: keine Indolbildung aber Ammoniak-entwicklung. — VOGES-PROSKAUER-Reaktion: (Acetylmethylcarbinolbildung) negativ. — Leber- und Cystinbouillon: keine H₂S-Bildung. — Harnstoffspaltung: Negativ. — Citrat kann nicht als einzige Kohlenstoffquelle verwertet werden. — Gelatine oder hitzeokoagulierte Serum werden nicht verflüssigt. — Kohlenhydratangriff: Negativ (geprüft wurden: Dextrose, Saccharose, Lactose, Xylose, Mannit, Maltose, Arabinose, Galaktose, Stärke). — Pepton: starke Ammoniak-Entwicklung.

Klassifizierung des Nephridialkeimes:

Unter Zugrundelegung des Systems von BERGEY kann der Keim entweder der Ordnung I: *Eubacteriales* eingeordnet werden, Unterord. I *Eubacteriineae* oder der Ord. II *Actinomycetales*. Dabei gibt allerdings nur die Neigung zur Fadenbildung

¹ Eine Reinkultur des Keimes ist deponiert im Centre de Collection des Types Microbiens (Lausanne), in der American Type Culture Collection (Washington) und in der National Collection of Type Cultures (London).

Anlaß, an eine Zugehörigkeit zur Ordnung der *Actinomycetales* zu denken; das Fehlen von Verzweigungen und Sporen sowie auch das Fehlen weiterer fakultativer Merkmale, die in der Ord. II vorkommen (z. B. Säurefestigkeit) läßt es dagegen schließlich doch als unzulässig erscheinen, ihn den *Actinomycetales* zuzurechnen. — Unter den 13 Familien der Unterordnung I: *Eubacteriineae* (Ord. I *Eubacteriales*) kommt nach dem gegebenen Schlüssel lediglich die VIII. Familie: *Corynebacteriaceae* in Betracht, in deren allgemeine Charakteristik sich der Keim zwanglos einpassen läßt. Unter den 3 Genera: *Corynebacterium*, *Listeria*, *Erysipelothrix* käme für eine evtl. Zugehörigkeit sowohl das erste als auch das dritte Genus in Frage. Da aber — jedenfalls nach dem bis jetzt gültigen Einteilungsprinzip — das Genus: *Erysipelothrix* nur für Warmblüter pathogene Species umfassen soll, so bleibt vorläufig nur eine Einreihung in das Genus: *Corynebacterium* übrig. Die Species dieses Genus sind bei BERGEY primär nach ihrer Herkunft geordnet (vom Menschen, von Haus- und Laboratoriumstieren, von Insekten, von Pflanzen, aus Boden und Wasser).

Vergleicht man die Beschreibung der einzelnen Species mit den Eigenschaften des von uns aus Blutegeln gewonnenen Nephridialkeimes, so ergibt sich eine auffallende Übereinstimmung desselben mit der Art: *Corynebacterium equi*. (Gleichheit in den Merkmalen Morphologie, Gelatine, Agarkolonien, Löffler-Serum, Lakmuspilch, Indol, Kohlenhydrate, Hämolyse; nur Ammoniak positiv, bei *C. equi* negativ, ferner eine geringfügige Temperaturverschiebung: 22—37° C gegen 25—37° C bei *C. equi*.) In BERGEYS Manual finden sich über *C. equi* noch weitere Angaben, die aber, da entsprechende Prüfungen von uns noch nicht durchgeführt wurden, nicht zum Vergleich herangezogen werden können. An Hand der vergleichenden Daten ergibt sich jedoch bis auf die fehlende Ammoniakbildung bei *C. equi* eine völlige Übereinstimmung. Wir erblicken in dieser Übereinstimmung vorläufig keineswegs einen Beweis für eine Identität des Egel-Nephridialkeimes mit *C. equi*; sie soll lediglich die sehr nahe Verwandtschaft zu *C. equi* bzw. überhaupt die Zugehörigkeit des Egel-Nephridialkeimes zum Genus: *Corynebacterium* dartun. — Wir schlagen daher für den regelmäßigen Harnblasenbewohner des Blutegels die Bezeichnung: *Corynebacterium vesiculare* vor.

b) Die frei im Egel-Harn vorkommenden Bakterien.

Neben dem mehr oder weniger fest an das Harnblasenepithel gebundenen *C. vesiculare* findet man, ebenfalls regelmäßig, bedeutend kürzere und plumpere Stäbchen von 1—2 μ Länge und 0,4—0,6 μ Breite frei im Harnblaseninhalte von Blutegeln (Abb. 16). Sie färben sich mit allen gebräuchlichen Farbstoffen gut und gleichmäßig an und sind grampositiv. Nach NEISSER gefärbt, zeigt sich deutlich Anfärbung eines Polkörnchens je Stäbchen. Sie zeigen sowohl im Ausgangsmaterial als auch nach Züchtung auf künstlichen Nährböden (s. u.) keine nennenswerte Variabilität ihrer Form; es besteht keinerlei Tendenz zu Faden- oder Kettenbildung. Die Lagerung der Stäbchen im mikroskopischen Präparat ist vorwiegend staketförmig, teils auch winkelig unregelmäßig. Keine Sporen und keine Geißeln.

Der Keim wächst auf allen gebräuchlichen, auch den einfachsten Nährböden gut unter obligat aeroben Bedingungen zwischen 22—37° C. Herabsetzung der Sauerstoffspannung (z. B. FORTNER-Platte) hemmt das Wachstum völlig.

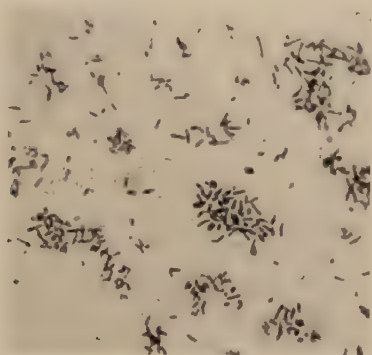


Abb. 16. *Corynebacterium nephridii* aus dem Harnblaseninhalte des Blutegels. Vergr. 1000fach.

Die Kolonien auf Nähragar (bzw. Dextrose-Agar) sind glattrandig, rund, kuppenförmig erhaben, bis 1,5 mm im Durchmesser, von weißlich-grauer bis bläulich-grauer Farbe, feuchtglänzend, schleimig. Keine Farbstoffbildung. — Gelatine-stich: Vorwiegend an der Oberfläche und im oberen Viertel des Stiches. — Blut-agar: nach 2—3 tägiger Bebrütung kleine graue bis weißliche Kolonien ohne Hämolyse. — Bouillon: (bzw. Dextrose-Bouillon) nach 24 Std diffuse aber schwache Trübung der Bouillon; dagegen deutliche Trübung in den obersten 2—3 mm unterhalb des Flüssigkeitsspiegels, besonders am Glasrand. Dieses aerobe Ringwachstum wird in den nächsten 3 Tagen noch deutlicher, wobei auch eine schleimige Konsistenz des Ringes zu erkennen ist; es bilden sich nämlich schleimige Schlieren, die von dem Wachstumsring in die Tiefe der Bouillon herabhängen (Abb. 17). Durch leichtes Schütteln oder Schwenken lassen sich diese Schleimfäden leicht zerteilen unter diffuser Trübung der Bouillon, wonach es später zur Bildung eines schleimigen Bodensatzes kommt.



Abb. 17. *Corynebacterium nephridii*. Schlieren in Bouillon.

Biochemisch ist dieser Keim auffallend inaktiv. Keines der geprüften Kohlenhydrate usw. (Dextrose, Lactose, Maltose, Saccharose, Xylose, Arabinose, Mannit, Stärke, Citronensäure) wurde angegriffen. — Keine Harnstoffspaltung. — Keine Indolbildung. — In Bouillon wird etwas Ammoniak gebildet. — Gelatine und LOEFFLER-Serum werden nicht verflüssigt. — In Lakmusmilch keine Gerinnung oder Säuerung; nach 10 tägiger Bebrütung Alkalisierung. — Nitrat wird nicht zu Nitrit reduziert. — VOGES-PROSKAUER-Reaktion: negativ.

Die Klassifizierung dieses Keimes bereitet keine großen Schwierigkeiten. Die einigermaßen charakteristische Lagerung und Polkörnchen-Bildung lassen unschwer seine Zugehörigkeit zur Familie der *Corynebacteriaceen* erkennen. Morphologisch weist er große Ähnlichkeit mit *C. pseudodiphtheriticum* auf, während er bezüglich seiner biochemischen Inaktivität *C. bovis* oder *C. paurometabolum* an die Seite gestellt werden könnte. Eine völlige Übereinstimmung der Daten mit einer der bekannten *Corynebakterien*-Species ist nicht vorhanden, weswegen wir diesen Keim als neue Species mit der Bezeichnung *Corynebacterium nephridii* einführen möchten.

Die zahlreichen von uns unternommenen Versuche, diesen zweiten Harnblasenbewohner mit dem zuerst beschriebenen *C. vesiculare* zu identifizieren, hatten ein negatives Ergebnis. In Anbetracht der geschilderten Pleomorphie des *C. vesiculare* wäre es naheliegend gewesen, *C. nephridii* für eine morphologische Variante von *C. vesiculare* zu halten. Es gelingt jedoch auf keine Weise, die betr. Reinkulturen ineinander zu überführen. Die morphologischen und kulturmorphologischen Eigenschaften der beiden Keime lassen sich nicht soweit annähern, daß von einer Identifizierung die Rede sein kann. Dies gilt im besonderen auch für die markante Farbstoffbildung bei *C. vesiculare*, die bei *C. nephridii* immer fehlt.

Neben diesen beiden, konstant in der Egel-Harnblase vorkommenden *C. nephridii* und *C. vesiculare*, die entweder im Verhältnis einer Symbiose oder Synökie zu ihrem Wirkungsorganismus stehen, finden sich im Egelharn gelegentlich noch andere Bakterien, die man auch auf der Oberfläche der Egelepidermis in wechselnder Häufigkeit antrifft. Diese Keime, welche in einem späteren Abschnitt behandelt werden sollen, wandern offenbar durch die Ausführungsgänge der Harnblase von außen in diese ein, ohne jedoch zu diesem Standort eine festere Beziehung zu haben. Irgendwelche Anhaltspunkte für eine symbiontische oder physiologische Beziehung dieser Epidermiskeime zur Egelharnblase haben sich nicht ergeben.

c) Die Bedeutung von *C. vesiculare* und *C. nephridii* für den Ammoniak-Gehalt des Egelharns.

Über den hohen Ammoniakgehalt des Egelharns ist man seit den Arbeiten von PÜTTER hinreichend unterrichtet und hat hieran wiederum verschiedene Hypothesen über den N-Stoffwechsel des Blutegels und anderer Anneliden geknüpft, auf die hier jedoch nicht im Einzelnen eingegangen werden soll. Quantitative Angaben über die Stickstoffausscheidung bei *H.* stammen von BRACONNIER-FAYEMENDY. Danach werden von Hungertieren etwa 72% des Stickstoffs in Form von Ammoniak ausgeschieden. Nach Fütterung beträgt der Anteil an

Ammoniak-Stickstoff allerdings nur 40% des Gesamtstickstoffs; ein etwa gleichgroßer Anteil wird in Form nicht näher definierbarer Stickstoffverbindungen ausgeschieden.

Diese und ähnliche Untersuchungsergebnisse wurden in der Weise gewonnen, daß man laufend das Wasser in den Haltungsgefäßen der Egel auf Ammoniak und die anderen stickstoffhaltigen Substanzen untersuchte. Vom bakteriologischen Standpunkt aus betrachtet, ist ein solches Vorgehen allerdings als methodisch falsch zu bezeichnen. Schon die im Wasser der Haltungsgefäße und auf der Egeloberfläche befindliche Bakterienflora ist in der Lage, einen rapiden Abbau höhermolekularer organischer Stickstoffverbindungen in kürzester Zeit herbeizuführen, d. h. diese zu desaminieren, so daß Ammoniak-Bestimmungen im Wasser der Haltungsgefäße so gut wie nichts über die ursprüngliche Harnbeschaffenheit aussagen, vielmehr lediglich Angaben über die Endprodukte des Bakterien-Stoffwechsels darstellen.

1. Der Ammoniak-Gehalt des Egelharns in vitro.

Um diesen grundsätzlichen Fehler der früheren Untersucher auszuschalten, gewannen wir den Harn durch Punktion der freipräparierten Harnblase mittels vorher gewogener Glascapillaren. Nach abermaliger Wägung des gewonnenen Harns wurde die Glascapillare in eine Mikro-Destillationsapparatur verbracht (Einzelheiten der Methodik s. b. P. L. KIRK, Quantitative Ultramikroanalysis, N.Y., London 1950), das abdestillierte Ammoniak in 0,025 n/H₂SO₄ aufgefangen und mit 0,025 n/NaOH mittels Mikrotitrationseinrichtung titriert. Hierbei wurden bei 7 Egeln die in Tab. 5 wiedergegebenen Werte gefunden:

Tabelle 5.

<i>H. medicinalis</i>	Ammoniakgehalt des Blasenharns in γ /ml	umgerechnet auf mg %
1	207,7	20,77
2	95,4	9,54
3	62,0	6,20
4	56,1	5,61
5	212,5	21,25
6	236,1	23,61
7	335,5	33,55

Es kann also zunächst bestätigt werden, daß der Egelharn bereits in der Harnblase beträchtliche Mengen freien Ammoniaks enthält, daß jedoch erhebliche individuelle (oder zeitliche!) Unterschiede bestehen. Von der Vermutung ausgehend, daß der in der Harnblase enthaltene Harn seinen hohen Ammoniakgehalt ausschließlich oder vorwiegend der bakteriellen Zersetzung verdankt, wurde zunächst der Ammoniakgehalt

von Harnproben, die durch Punktion gewonnen worden waren, über mehrere Tage verfolgt. Hierzu wurden mit steriler Glascapillare wie vorher Harnproben gewonnen, die zur Abschwächung des etwaigen Verdunstungsverlustes noch mit 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt wurden. Nach sofortiger Bestimmung des anfänglichen Ammoniak-Gehaltes wurde das betr. Röhrchen mit Wachs verschlossen, bei 37° C bebrütet und in gewissen Zeitabständen die Ammoniakbestimmung wiederholt. Hierbei ergab sich, wie Abb. 18 zeigt, eine kontinuierlich fortschreitende Zunahme des Ammoniak-Gehaltes in der betr. Harnprobe.

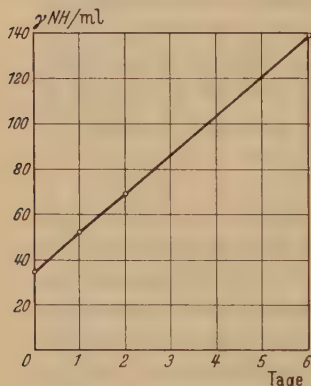


Abb. 18. Zunahme des Ammoniak-Gehaltes im Harn des Blutegels.

pracillin¹ für geeignet befunden, die Standortflora der Egelharnblase in vivo komplett zu vernichten.

Zunächst wurde durch entsprechende Versuche festgestellt, daß Supracillin in frischem Rinderserum gelöst, auch in relativ großen Mengen von Egel gut vertragen wird, was bei Verabreichung wäßriger Suspensionen nicht der Fall war. Die Egel erhielten im Hauptversuch (20 mg Supracillin = 25000 Einh. Penicillin + 25000 Einh. Streptomycin) in 2 ml Rinderserum durch den Hautmuskelschlauch in den Darm injiziert.

Corynebacterium vesiculare wird von Supracillin in vitro bei einer Konzentration von unter 7 γ /ml, *Corynebacterium nephridii* bei einer Konzentration von 15 γ /ml völlig gehemmt.

Steril gewonnener Harn von supracillin-behandelten Egel erwies sich bei Impfung auf Blutagar als keimfrei; d. h. das mit dem Harn in die Blase ausgeschiedene Supracillin bewirkt nicht allein Bakteriotase sondern völlige Bactericidie gegenüber der Blasenflora von Blutegeln.

Auf Grund dieser Versuchs-Ergebnisse wurde nun im Hauptversuch wie folgt verfahren:

9 Egel wurden in der beschriebenen Weise einmal mit Supracillin behandelt, nach 4—5 Tagen die Harnproben unter sterilen Bedingungen

¹ Ein Gemisch von Penicillin und Streptomycin von großer Breitenwirkung. Hersteller: Chemie-Grünenthal G.m.b.H., Stolberg i. Rh.

2. Ammoniakgehalt des Egelharns in vivo.

Um festzustellen, ob der Egelharn auch nach Ausschaltung der Blasenflora in vivo Ammoniak bzw. gleich große Mengen Ammoniak enthält, wurden folgende Versuche angestellt:

Nach in vitro-Testung und in vivo-Erprobung verschiedener Antibiotica wurde das Antibioticum Supracillin

gesammelt und der Ammoniakgehalt darin bestimmt. Das erhaltene Durchschnittsergebnis wurde mit der Ammoniak-Bestimmung im Harn von 15 unbehandelten Egelu verglichen:

Durchschnittl. Ammoniakgehalt des normalen Egelharns:	162,6 γ /ml
Durchschnittl. Ammoniakgehalt des Harns supracillin-behandelter Egel	52,5 γ /ml

Dieses Ergebnis zeigt zumindest, daß ein großer Teil (also etwa 67,5%) des Harn-Ammoniaks nicht von den Nephridien abgeschieden, sondern nachträglich von der Blasenflora aus organischen, stickstoffhaltigen Ausscheidungsprodukten gebildet wird. Hypothetisch besteht sogar die Möglichkeit, daß auch die nach Supracillin-Vorbehandlung im Egelharn gefundenen Ammoniak-Mengen ebenfalls nicht von den Nephridien abgeschieden worden sind, sondern durch Enzyme, die aus den abgestorbenen Blasenbakterien (*C. vesiculare* und *C. nephridii*) stammen, aus stickstoffhaltigen, organischen Ausscheidungsprodukten in Freiheit gesetzt wurden. Dieser Frage wurde aber vorläufig experimentell nicht weiter nachgegangen, so daß wir uns auf die Aussage beschränken, daß zumindest der größte Teil des Ammoniaks im Egeldarm durch bakterielle Zersetzung des Harns entsteht und nicht von Nephridialzellen abgesondert wird.

Das regelmäßige Vorkommen von *C. vesiculare* und *C. nephridii* in der Egelharnblase legt zwar die Vermutung nahe, daß es sich bei diesen Keimen um Symbionten des Blutegels handelt. Da jedoch auf Grund der bisher vorliegenden Untersuchungen nur ein einseitiger Nutzen in dem Zusammenleben dieser Bakterien mit dem Blutegel, und zwar zugunsten der Bakterien vorzuliegen scheint, während ein Nutzen für das Wirtstier nicht erkennbar ist, möchten wir es zunächst dahingestellt sein lassen, ob hier ein Symbiose-Verhältnis besteht oder nicht. Auf jeden Fall stehen diese Blasenkeime in einem engeren Verhältnis zu ihrem Standort als es bei den anderen, gelegentlich in der Harnblase des Egelu angetroffenen Bakterien der Fall ist.

Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse über die Nephridial-Flora des Blutegels (*H. officinalis* u. *medicinalis*).

1. Entgegen der vorherrschenden Meinung, daß die Blase des Blutegels mit einem Flimmerepithel ausgekleidet sei, wird gezeigt, daß die angeblichen „Cilien“ in Wirklichkeit einen Bakterienbesatz darstellen.

2. Der fädige Besatz der Blutegelharnblase besteht aus der Reinkultur eines Bakteriums, welches auf Grund seiner morphologischen, färberischen, kultur-morphologischen und biochemischen Eigenschaften als zur Familie der *Corynebacteriaceen* und zum Genus: *Corynebacterium* gehörig erkannt wurde. Es erhielt die Bezeichnung: *C. vesiculare* nov. spec.

3. Außer *C. vesiculare* kommt in der Egelharnblase regelmäßig ein zweites Bakterium vor, welches nicht an die Blasenwand attachiert ist, sondern frei im Blasen-harn lebt. Auch dieser Keim gehört zur Gruppe der *Corynebakterien* und erhielt die Bezeichnung: *C. nephridii* nov. spec.

4. *C. vesiculare* und *C. nephridii* sind regelmäßige Bewohner der Egelharnblase bei *Hirudo officinalis* und *H. medicinalis*. Ihre Fähigkeit, aus niedermolekularen Eiweißbruchstücken Ammoniak abzuspalten wird als die Hauptursache des hohen Ammoniakgehaltes im Egeldarm angesehen.

V. Die Bakterienflora der Egeloberfläche.

Die Körperoberfläche des medizinischen und offizinellen Blutegels ist mit einer feinen elastischen Schicht, der Cuticula, bedeckt, welche einen Überzug von Schleim besitzt, der von den hypodermalen und subhypodermalen Drüsen abgesondert wird. Beim Kriechen über trockene Flächen wird die Schleimproduktion angeregt, so daß der sich fortbewegende Blutegel eine Schleimspur hinterläßt. Die zäh-viscöse Beschaffenheit der Körperoberfläche stellt eine ideale Haftfläche für Mikroorganismen dar, die sich auch in reicher Zahl dort vorfinden.

Da sowohl bei der ständigen Absonderung und Neuproduktion von Schleim sowie infolge der in kurzen Zeitabständen erfolgenden Abstreifung und Erneuerung der Cuticula auch eine laufende Abstreifung der Bakterienflora stattfindet, ist mit einem festen Artenbestand an Mikroorganismen auf der Egeloberfläche kaum zu rechnen. Vielmehr würde man erwarten, daß die auf der Egeloberfläche oder in der „Schleimhülle“ anzutreffenden Bakterien in allen Punkten mit der Bakterienflora des jeweiligen Milieus übereinstimmt, in welchem sich die Egel natürlicherweise aufhalten.

Bevor wir die von uns erhaltenen Befunde mitteilen, erscheint es uns jedoch notwendig, an einige Veröffentlichungen zu erinnern, die von einer „spezifischen Bakterienflora“ auf der Körperoberfläche von Blutegeln sprechen und seinerzeit erhebliches Aufsehen in interessierten Kreisen hervorgerufen haben.

a) „*Bacillus hirudinis*“ SCHWEIZER.

1935 wurde von DINAND u. BOTTENBERG über das angeblich regelmäßige Vorkommen eines „kleinen rasenden Torpedobacillus“ im „Verdauungsschleim“ des Blutegels berichtet, den sie, ohne allerdings die dürtigsten Belege hierfür vorzulegen, als einen Symbionten des Blutegels bezeichneten, „der ihn gegen andere von außen eindringende Keime schützt, ihm bei der Verdauung des aufgesogenen Blutes hilft“. Insbesondere schrieben sie dem „kleinen Blutegelbacill“ eine „Feindschaft gegen *Staphylo-* und *Streptokokken*“ zu, die sich angeblich habe therapeutisch verwenden lassen. Man hätte sich wohl mit diesen beiden Arbeiten nicht weiter zu beschäftigen brauchen, wenn nicht im darauffolgenden Jahr SCHWEIZER (1936a) die Existenz dieses Keimes, dem er die Bezeichnung „*Bacillus hirudinis*“ gab, bestätigt hätte. SCHWEIZER behauptet von diesem Keim etwa folgendes:

„Der Verdauungsschleim enthält den *Bac. hirudinis* in riesigen Mengen. Im Wasser bewegt er sich äußerst schnell in der Richtung der Längsachse hin und her und ändert seine Bewegungsrichtung oft durch Schwenkungen und Oscillationen. Eine Begeißelung konnte ich nicht beobachten(!)“. Er fand „Sporenbildung in Wasser nach 24 Std“; die Sporen seien sehr widerstandsfähig, z. B. „gegen 20%igen Alkohol, Borsäurelösung und Carbolwasser“. Daher seien Reinkulturen sehr leicht zu erhalten. Auf „kaltsterilisierten Blut-Gelatineplatten“ wuchs der Keim unter Hämolyse und Gelatineverflüssigung; auch vermochte er Fibrin, Casein, koagulierte Eiweiß und Gelbei aufzulösen. Beimpfte er dagegen Fleisch oder „andere

Nahrungsmittel“ bzw. „eiweißreiche Pflanzensäfte“ mit *Bac. hirudinis*, so blieben sie wochenlang frisch, während die Kontrollproben in Fäulnis übergingen. „Bringt man *Bac. hirudinis* mit anderen Bakterien (*Bac. tuberculosis*, *Eitermikrokokken*, *Bac. prodigiosum*, Essig- und Buttersäurebakterien und viele andere) zusammen, so gehen die Reinkulturen ein.“ — „Kurz, der Blutegelbacillus hält fast sämtliche fremden Mikroben von sich fern.“ Er bezeichnet daher diesen Keim als einen „spezifischen Symbionten des Blutegels“. SCHWEIZER hielt diesen Keim auch für eine therapeutische Verwendung als geeignet und empfahl in einem Brief vom 30. Jan. 1937 an BOTTENBERG, eine „Blutegelbakterien-Aufschwemmung Malaria-Kranken zu injizieren“. — H. CALLSEN, der von dem „bakteriologischen Rätsel des Blutegels“ fasziniert worden war, belästigte in den Jahren 1938—1940 das ROBERT KOCH-Institut, andere Hygienische Institute, namhafte Kliniken sowie den „Generalinspekteur für das Veterinärwesen im OKH“ in zahlreichen Briefen und Rundschreiben mit dem dringlichen Anliegen, den „*Bacillus hirudinis*“ kranken Menschen und Tieren zu injizieren, um damit ungeahnte Heilmöglichkeiten zu erschließen, denn: „Entnimmt man einem vollgesaugten Blutegel einen Tropfen Blut und betrachtet denselben unter dem Mikroskop, so sieht man einen ungewöhnlich kräftigen Bacillus, der der Torpedoform hat, mit unfäßlicher Geschwindigkeit hin und her sausen. Er speißt dabei alle artfremden Mikroorganismen auf und vernichtet diese.“

Es ließen sich aus der Arbeit von SCHWEIZER sowie aus den zahllosen Schreiben des „Biologen“ CALLSEN noch weitere phantasievolle Einzelheiten über diesen „*Bacillus hirudinis*“ zitieren. Praktische Ergebnisse haben die Bemühungen um die Einführung dieses zu therapeutischen Zwecken vorgeschlagenen *B. hirudinis* glücklicherweise nicht gehabt, zumal von den Initiatoren auch keinerlei bakteriologische oder tierexperimentelle Versuchsergebnisse von überzeugendem Wert vorgewiesen werden konnten.

Immerhin glaubten wir doch wenigstens, der Angabe trauen zu dürfen, daß dieser „*Bacillus hirudinis*“ sich — wenn auch nicht „regelmäßig und in Reinkultur“ — so doch wenigstens häufig oder manchmal am oder im Blutegel finden würde und fahndeten nun mit allen zur Verfügung stehenden Mitteln nach diesem Keim, der sich nach DINAND u. BOTTENBERG, SCHWEIZER sowie WEILER mit geringer Mühe finden lassen würde, obwohl schon MOOTZ 1936 bei Nachprüfungen obiger Angaben den „Blutegelbacillus“ nicht finden konnte; vielmehr mit Regelmäßigkeit ein bewegliches gramnegatives Stäbchen fand, das er als „*Kaltblüter Colibacterium*“ bezeichnete, also wahrscheinlich die von uns beschriebene *Ps. hirudinis*.

Zum Nachweis des „*Bac. hirudinis*“ wurden insgesamt 46 Blutegel verschiedener Herkunft [ungarische und jugoslawische Importe (*H. officinalis*), aus Teichen Oberhessens und norddeutschen Züchtereien (*H. medicinalis*)] verwendet. Sogleich die ersten orientierenden Untersuchungen zeigten, daß die Körperoberfläche des Blutegels stets von einer Vielzahl der verschiedensten Bakterienarten, vorwiegend gramnegativen, z. T. auch grampositiven Stäbchen besiedelt ist.

Es würde zu weit führen, die zahlreichen Versuchsanordnungen hier ausführlich zu beschreiben, mit denen wir versuchten, den „*Bacillus hirudinis*“ nachzuweisen. Weder nach den von SCHWEIZER (1936a) angegebenen Verfahren, z. T. auch unter Verwendung „kaltsterilisierter Blutgelatineplatten“ (1936b), noch mittels der üblichen bakteriologischen Methoden (Einzelheiten bei FREYTAG) gelang es jemals, ein Bakterium an oder in Blutegeln nachzuweisen, dessen Eigenschaften mit der dürftigen Beschreibung des „*Bacillus hirudinis*“ in Übereinstimmung standen. Keiner der gefundenen Keime (s. u.) besaß irgendwelche antibiotischen Eigenschaften.

Auch der Versuch, durch Herrn SCHWEIZER persönlich in den Besitz dieses mysteriösen Keims zu gelangen, scheiterte. Auf Anforderung einer Reinkultur des *Bac. hirudinis* erhielten wir von Herrn SCHWEIZER zunächst die Mitteilung, er besäße den Keim z. Zt. nicht mehr, gab uns jedoch nochmals die bekannten Hinweise, wie man „*Bac. hirudinis*“ aus dem „Verdauungsschleim“ gewinnen könnte. Nach Mitteilung, daß uns dies leider nicht gelungen sei, schickte Herr SCHWEIZER ein Schrägagar-Röhrchen, welches lt. Begleitschreiben eine Reinkultur des „*Bac. hirudinis*“ enthalten sollte. Sowohl das Originalröhrchen als auch Abimpfungen davon wiesen jedoch keineswegs eine Reinkultur auf, sondern bestanden aus dem gewöhnlichen Keimgemisch, welches man stets auf der Egeloberfläche antrifft. „*Bac. hirudinis*“ war nicht darunter.

Nachdem es uns somit in einer für unsere Ansprüche hinreichenden Zahl von Versuchen nicht gelungen war, den „*Bac. hirudinis*“ zu finden, und selbst Herr SCHWEIZER nicht in der Lage war, uns diesen Keim zur Verfügung zu stellen, halten wir es für angebracht, das „bakteriologische Rätsel des Blutegels“ als gelöst und damit alle daran geknüpften, z. T. recht anspruchsvollen Spekulationen als hinfällig zu betrachten.

b) Die Bakterien der Egeloberfläche.

Wie bereits erwähnt, ist die Egeloberfläche unter natürlichen Bedingungen mit einem bunten Keimgemisch besiedelt, dessen Zusammensetzung im wesentlichen mit der Bakterienflora des natürlichen Standortes der Blutegel übereinstimmen dürfte, d. h. sie besteht vorwiegend aus ubiquitär verbreiteten Wasser- und Bodenbakterien. Eine Teilanalyse dieses Keimgemisches ergab folgendes:

Am häufigsten fanden sich *Pseudomonas convexa* (Chester), *Pseudomonas desmolyticum*, ebenfalls häufig *Achromobacter*-Arten wie: *Achromobacter liquefaciens* und *Alcaligenes metalcaligenes* sowie die oben erwähnten *C. vesiculare* und *nephridii*, seltener sporenbildende *Bacillus*-Arten, Hefen, Schimmelpilzsporen sowie Protozoen.

Keine der genannten Bakterienarten kommt regelmäßig vor; vielmehr ist die Bakterienflora der Egeloberfläche von durchaus wechselnder Arten-Beteiligung. Keine dieser Keimarten vermag sich etwa wegen elektiver Anpassung an das Milieu oder vermittels antibiotischer Fähigkeiten gegenüber den anderen Keimarten als besonders charakteristischer Bewohner des Hautschleims durchzusetzen, geschweige denn als obligater Symbiont aufzutreten. Eine Beziehung der Oberflächenflora zur

Physiologie des Blutegels konnte von uns nicht entdeckt werden. Allerdings ergaben sich Anzeichen dafür, daß diese Mischflora die in Abstoßung begriffene bzw. abgestoßene Cuticula, die aus einem Gemisch von Eiweiß und Chitin zu bestehen scheint, als Nährstoffquelle zu benutzen vermag. Die Untersuchungen hierüber sind noch nicht abgeschlossen, so daß Einzelheiten noch nicht mitgeteilt werden können.

Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse über die Bakterienflora der Egeloberfläche.

1. Die Angaben über die Existenz eines spezifischen Symbionten der Blutegeloberfläche, der angeblich für die „Reinhaltung der Egeloberfläche“ sorgen soll, konnte nicht bestätigt werden. Die Existenz des „*Bacillus hirudinis*“ nach SCHWEIZER sowie dessen behauptete Symbionteneigenschaft wird bezweifelt.

2. Die Bakterienflora der Egeloberfläche ist vielmehr von durchaus inkonstanter und sehr heterogener Zusammensetzung. Außer verschiedenen, gewöhnlichen Wasser- und Bodenbakterien finden sich gelegentlich *Schimmelpilzsporen*, *Hefen* und *Protozoen* im Hautschleim des Blutegels.

3. Eine engere Beziehung der Oberflächen-Bakterienflora zur Physiologie des Blutegels konnte nicht festgestellt werden.

Zusammenfassung¹.

1. Blutegel (*Hirudo officinalis* und *H. medicinalis*) besitzen einen obligaten bakteriellen Darmsymbionten: *Pseudomonas hirudinis*, der für die Aufschließung des Nahrungsblutes verantwortlich ist. Dieser alleinige Bewohner des Egeldarms wird durch einen festen Übertragungsmechanismus über die Kokonflüssigkeit an die Nachkommenschaft weitergegeben.

2. In der Egelharnblase kommen regelmäßig 2 Corynebakterienarten vor: *C. vesiculare* und *C. nephridii*. — Der angebliche Cilienbesatz des Harnblasenepithels erweist sich als eine Reinkultur von *C. vesiculare*. — Beide Bakterienarten sind in der Lage, aus organischen Harnbestandteilen größere Mengen von Ammoniak in Freiheit zu setzen.

3. Auf der Egeloberfläche findet sich eine, je nach dem Bakteriengehalt des Biotops wechselnde Bakterienflora heterogener Zusammensetzung. Eine physiologische Beziehung dieser epiphytischen Flora zum Blutegel konnte nicht ermittelt werden.

Die Existenz des „*Bacillus hirudinis*“ nach Schweizer wird in Zweifel gezogen.

Literatur.

AUTRUM, H. u. E. GRAETZ: Z. vergl. Physiol. **21**, 427 (1935). — BOLSIUS, H.: Cellule **5**, 367 (1889). — BOURNE, A. G.: Quart. J. Microsc. Sci. **24**, 419 (1884). — BRACONNIER-FAYEMENDY, M.: Zit. nach C. HEIDERMANN'S Tab. Biolog. **14**, 1, 209 (1937). — BREED, R. S., E. G. D. MURRAY u. A. P. HITCHENS: BERGEYS Manual of determinative Bacteriology. 6. Aufl. Baltimore: Williams and Wilkins Comp. 1948. — BUCHNER, P.: Tier und Pflanze in Symbiose. 2. Aufl. Berlin: Bornträger 1930. — BUCHTHAL, F. u. G. G. KNAPPEIS: Die Doppelbrechung der einzelnen Zelle. In

¹ Teilzusammenfassungen S. 70, 81, 85.

- Tabulae Biologicae **19** (Cellula), 1 (1939). — BÜSING, K. H.: Arch. Hyg. **133**, 63 (1950); Cbl. Bakt. I. Orig. **157**, 478 (1951). — DINAND, F. u. H. BOTTENBERG: Med. Welt **32**, 1147 (1935); Umschau **39**, 972 (1935). — DIWANY, H. EL.: Etude histologique de l'embryotropie hématique des mammifères et du tube digestif de quelques invertébrés hématophages. Thèse Fac. Sci. Paris (1919). — DÖLL, W.: Die Bedeutung der *Pseudomonas hirudinis* für die Verdauungsphysiologie des medizinischen Blutegels. Diss. Marburg 1952. — FERMI, C. u. U. CANO: Ann. Igiene sper. (N.S.) **24**, 575 (1911). — FREYTAG, K.: Über die Bakterienflora der Haut und der Segmentalorgane von *Hirudo officinalis* und *medicinalis*. Diss. Marburg 1952. — FUKUI, T.: Z. vergl. Physiol. **6**, 217 (1926). — GRAETZ, E., u. H. AUTRUM: Z. vergl. Physiol. **22**, 273 (1935). — GRAF, A.: Act. Leopoldina (Halle) **72**, 215 (1899). — GURWITSCH, A.: Morphologie und Biologie der Zelle. Jena: G. Fischer 1904. — HALLMANN, L.: Klin. Chemie und Mikroskopie. 6. Aufl. 1950. — HERTER, K.: BRONNS Klassen und Ordnungen des Tierreiches. Bd. 4, III. Abt., 4. Buch, Teil 2. Leipzig 1939. — HORNOSTEL, H.: Cbl. Bakt. I. Orig. **148**, 36 (1942). — JASCHKE, W.: Z. Parasitenkunde **5**, 515 (1933). — KORZHUEV, P. A. and S. R. KHUDAIBERDEEV: Bull. Biol. et Med. exper. UdSSR **3**, 443 (1937). — KOWALEWSKI, A.: Mém. Ac. Sci. St. Petersburg, Physikal.-math. Kl. (8), **5**, 1 (1897). — KRUKENBERG, F. W.: Zit. nach HERTER. — LEHMENSICK, R.: Cbl. Bakt. I. Orig. **147**, 317 (1941); **149**, 153 (1943). — LEUCKART, R. u. G. BRANDES: Die Parasiten des Menschen. Leipzig 1886—1901. — MARCHAL, P.: Mém. Soc. Zool. France **3**, 31 (1889). — MOOTZ, R.: Med. Welt **33**, 1552 (1936). — MÜHLING, P.: Die Übertragung von Krankheitserregern durch Wanzen und Blutegel. Diss. Königsberg 1899. — PÜTTER, A.: Z. allgem. Physiol. **6**, 217 (1907). — REICHENOW, E.: Arch. f. Protistenkunde **45**, 95 (1922). — ROUBAUD, E.: Ann. Inst. Pasteur **33**, 489 (1919). — SCHWARTZ, W.: Arch. f. Mikrobiologie **6**, 369 (1935). — SCHWEIZER, G.: Arch. f. Mikrobiologie **7**, 235 (1936a); **7**, 297 (1936b). — SCRIBAN, J. A. u. H. AUTRUM: in: KÜKENTHAL, Handbuch d. Zoologie II, 2, 1928—1934. — SNIESKO, S. F.: Persönl. Mitt. (aus dem Microbiological Lab. U.S. Fish and Wildlife Service, Kearneysville, W. Va.). — STEFFENHAGEN, K. u. P. ANDREJEW: Arb. Kais. Ges. Amt **36**, 221 (1911). — WEILER, P.: Experientia **5**, 446 (1949). — WEISS, O.: In NAGELS Handbuch d. Physiologie Bd. 4, 1909. — WERNIG, H.: Cbl. Bakt. I. Orig. **145**, 270 (1940). — WILLSTÄTTER, R. u. F. MEMMEN: Z. physiolog. Chemie **129**, 1 (1923). — ZIRPOLO, G.: Boll. Soc. Natural. Napoli **34**, 12 (1923).

(Aus dem Laboratorium der Firma E. Tosse & Co., Hamburg-Wandsbek.)

Speicherung von Schwermetallen in niederen Organismen.

Von

M. LANGE-DE LA CAMP und W. STEINMANN.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 31. März 1953.)

Über die physiologische Wirkung von Schwermetallen wurden Arbeiten auf sehr verschiedenen biologischen Forschungsgebieten durchgeführt. Die Lebensnotwendigkeit des Eisens als des Zentralatoms des roten Blutfarbstoffs ist für alle hämoglobinführenden Organismen unbestritten, zum anderen aber weiß man auch, daß es für sämtliche Lebewesen eine Rolle bei der Zellatmung spielt. Heute besteht kein Zweifel mehr, daß auch eine Reihe anderer Schwermetalle zumindest für bestimmte Organismen oder Organismen-Gruppen unentbehrlich ist. Es wurde untersucht, ob und inwieweit sich bestimmte Schwermetalle für das Leben bestimmter kleinerer oder größerer systematischer Einheiten als spezifisch notwendig erweisen.

Aus der Fülle der Veröffentlichungen über den Einfluß von Metallen auf Wachstum und Entwicklung niederer Organismen seien beispielsweise Arbeiten an *Aspergillus niger*, *Phycomyces Blakesleeanus*, *Hefe* und *Chlorella* mit Zink erwähnt, auf Grund derer dieses Metall in die Reihe der lebensnotwendigen Elemente zu rücken schien, nachdem schon vorher bzw. gleichzeitig die Unentbehrlichkeit des Kupfers für Wachstum und Sporenbildung bei *Aspergillus* und anderen Schimmelpilzen und später seine Bedeutung als Wirkstoff in Phenolaseen erkannt worden war. Mit der Rolle, die gerade dieses Element für das Gedeihen höherer Pflanzen spielt, hat sich neben der botanischen Forschung die Landwirtschaftswissenschaft in einer Reihe von Arbeiten befaßt.

Beim Menschen und den höheren Tieren nahmen naturgemäß die Untersuchungen über das Eisen als Zentralatom des roten Blutfarbstoffes den größten Raum ein. In der Humanmedizin erschien gegenüber Eisen die Therapie der Anämien mit anderen Schwermetallen, z. B. Arsen und Kupfer, zunächst als unbegründet und von untergeordneter Bedeutung. Nachdem aber das Kupfer als Zentralatom des Hämocyanins erkannt worden war, lag die Frage nach der zumindest partiellen Ersetzbarkeit des Eisens durch Kupfer nahe. In neuester Zeit rückte in der Behandlung der Anämien nun das Kobalt in den Mittelpunkt des Interesses. Schon länger war von veterinärmedizinischer Seite behauptet worden, daß die „pine-disease“ der Schafe durch Kobaltfütterung zu heilen sei. Entsprechende therapeutische Erfolge beim Menschen konnten jedoch zunächst nicht verzeichnet werden. Inzwischen hat man erkannt, daß dem Kobalt als einem Bestandteil des Vitamins B₁₂ eine bestimmte physiologische Rolle zukommt. Seine therapeutische Wirksamkeit in bestimmter Bindung bei makrocytären Anämien steht heute fest. Daß es daneben auch in anderer Form physiologische Wirkungen, insbesondere auf Blutbildung und Blutverteilung zeitigen kann, scheint durch die Studien von WEISS-BECKER bewiesen zu sein.

Die unterschiedliche Wirkung bei verschiedenen Darreichungsformen dieses Metalls lenkte die Aufmerksamkeit nun auf eine möglicherweise bestehende Funktion der Darmsymbionten hin, nämlich: Die makrocytären Anämieformen sind mit Veränderungen der Darmflora verbunden, und es liegt die Vermutung nahe, daß einem Teil der Darmsymbionten die Aufgabe zufällt, vermöge einer spezifischen Affinität zu einem bestimmten Schwermetall, beispielsweise zum Kobalt, bei entsprechendem Angebot organische Verbindungen mit bestimmten Schwermetallkernen zu synthetisieren. So ist es verständlich, daß es auch in bezug auf den Schwermetallstoffwechsel höherer Lebewesen von Bedeutung sein kann, etwas über die Assimilationsbereitschaft niederer Organismen für das in Frage stehende Element zu erfahren.

Besteht nun eine solche Assimilationsbereitschaft, so muß sich das betreffende Element — zumindest vorübergehend — in der Zelle finden lassen. Wir haben uns die Aufgabe gestellt, bei verschiedenen niederen Organismen etwas über den Verbleib des im Medium angebotenen Schwermetalls zu ergründen und berichten hier über unsere Versuche mit Kupfer, Kobalt, Nickel, Eisen und Antimon bei *Mucor racemosus* Fres und *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, die wir als leicht kultivierbare Mikroorganismen in Versuchen, die von Oktober 1947 bis zum Sommer 1952 mit verschiedenen Pilzen durchgeführt wurden, auswählten.

I. Kulturmethodik.

Die Kulturversuche wurden auf festen und flüssigen Nährmedien unter Zusatz von verschiedenen Schwermetallsalzen in abgestufter Konzentration angestellt. Zur Klärung der Wuchsbedingungen wurden zunächst Laboratoriumsversuche und später unter Ausnutzung der gewonnenen Erkenntnisse einige Großversuche mit *Bäckerhefe* in der Nordd. Hefeindustrie, Hamburg-Wandsbek, durchgeführt.

Bei der Kultivierung von *Mucor* auf festen Nährböden in PETRI-Schalen erwies sich ein Malz-Zucker-Pepton-Agar folgender Zusammensetzung als besonders günstig: Bio-Malz 15 g, Rohrzucker 15 g, Pepton 10 g, Agar 15 g; mit Wasser auf 1000 cm³ auffüllen.

Diesem Nährboden wurden Kupfer- bzw. Kobalt- bzw. Nickelsalze [Cu SO₄ · 5H₂O p. a. Merck, Co (NO₃)₂ · 6H₂O pur. cryst. Merck und Ni (NO₃)₂ · 6H₂O] in einer Menge von 1,0 g bzw. 0,1 g Metallsalz/Liter Kulturmedium zugesetzt.

Bei der Kultur von *Mucor* und *Hefe* in flüssigen Medien verwendeten wir organische Nährlösungen mit verschiedenen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen. Beim Vergleich des Wuchses von *Mucor racemosus* erwies sich Pepton den anorganischen Stickstoffquellen (Ammon- und Nitratstickstoff) überlegen. Gutes Wachstum wurde mit einer Nährlösung (im folgenden mit III bezeichnet) folgender Zusammensetzung erzielt: Saccharose 15 g, Bio-Malz 15 g, Pepton 10 g, Mg SO₄ 0,2 g, Ca Cl₂ 0,5 g, KH₂ PO₄ 0,1 g; mit Wasser auffüllen auf 1000 cm³. Neben dieser Nährlösung wurde zeitweilig auch eine Nährlösung verwendet, bei der nur 30 g Malz-extrakt in 1 l Aqua dest. gelöst worden war (Nährlösung IV).

Diesen Nährlösungen wurden nun wiederum Kupfer- bzw. Kobalt- bzw. Nickelsalze wie oben und Eisen als Fe Cl₃ · 6 H₂O p. a. Merck zugesetzt, und zwar 1,0 bzw.

0,1 bzw. 0,01 g Metallsalz/Liter. Für die Wuchsversuche mit Antimon verwandten wir Brechweinstein, Fuadin und Solustibosan. Der Brechweinstein wurde ebenfalls in den Konzentrationen 1,0 bzw. 0,1 bzw. 0,01 g/Liter der Nährlösung zugesetzt. Um einen Vergleich der verschiedenen Sb-Quellen zu erhalten, wurde der Zusatz von Fuadin und Solustibosan so eingerichtet, daß eine Sb-Konzentration von etwa 400 mg/Liter vorhanden war. Die Kulturversuche wurden jeweils in 3—6 Parallelen in 100 cm³ Jenaer ERLNMEYER-Kolben, beschickt mit 25 cm³ Nährlösung, bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Nachdem durch Laboratoriumsversuche ermittelt worden war, in welcher Größenordnung die Bäckerhefe ohne Wuchsschädigung zugesetzte Schwermetalle vertrug, wurden einige Großversuche bei der Nordd. Hefeindustrie, Hamburg-Wandsbek, mit der dort üblichen Gärtechnik, unter reichlicher Belüftung mit insgesamt 1800 l Nährmedium, durchgeführt. Die Konzentration an Zucker mit etwa 25—30 g/Liter und an Stickstoff mit 1 g/Liter entsprach derjenigen in unseren Laboratoriumsversuchen. Phosphorsäure, in Form von Superphosphat in einer Menge von etwa 1,6 g/Liter zugefügt, lag somit wesentlich höher als in unseren Laboratoriumsversuchen. Durch die Zugabe von Stickstoff in Form von Ammonsulfat und Ammoniak konnte die Acidität während des Gärverlaufs reguliert werden.

Bei den Versuchen mit Kobalt, Kupfer und Antimon konnte das p_H zwischen 5 und 6 gehalten werden, bei den Versuchen mit Eisen hingegen gelang dieses nicht. Beim Eisenchlorid-Versuch sank das p_H sogar zeitweilig auf 3,5. Nach einer Angärzeit von 1 oder 2 Std begannen wir, die in einem besonderen Behälter in Wasser gelösten Schwermetallsalze zulaufen zu lassen. Bei den Versuchen mit Kobalt wurden 270 g Co (NO₃)₂ · 6H₂O in 20 l Wasser gelöst. Der Zulauf begann nach 1 Std und erstreckte sich gleichmäßig über 10 Std. Die Zugabe war so eingerichtet worden, daß sich in dem Gärbottich im Durchschnitt eine Konzentration von etwa 0,15 g Kobaltsalz/Liter befand. Beim Kupfer wurde in analoger Weise verfahren, nur begannen wir mit dem Zulauf der Metallsalzlösung erst nach einer Angärzeit von 2 Std. Als Eisenzusätze wurden in einem Versuch Eisenchlorid und in einem zweiten ein Ferriammoniumcitrat mit einem Eisengehalt von 18% verwendet. Dabei lösten wir 270 g Eisenchlorid unter Zugabe von Weinsäure in 3 l Wasser bei einem p_H von 3,5 und verdünnten diese Lösung mit 20 kg Melasse. Der Zulauf begann nach 2 Std und war nach 10 Std beendet. Vom Ferriammoniumcitrat lösten wir 300 g in 20 l Wasser und ließen es nach 1 Std Angärzeit im Verlauf von 10 Std gleichmäßig zufließen. So betrug die Konzentration des Eisenchlorids wie die Konzentration der oben erwähnten Metallsalze etwa 0,15 g/Liter in der Gärflüssigkeit. Vom Ferriammoniumcitrat wählten wir eine um 10% höhere Konzentration, um auf etwa gleiche Eisenmengen in der Gärflüssigkeit wie beim Chloridversuch zu kommen. Antimon wurde als Brechweinstein zur Melasselösung hinzugegeben, und zwar 1,8 kg in 40 l Wasser gelöst. Der Zulauf begann nach 1 Std und war nach 10 Std beendet. Die Menge von 1 g/Liter hatte sich in den Laboratoriumsversuchen als gut verträglich erwiesen.

Nach Beendigung der Versuche wurden die so erhaltenen Schwermetallhefen nach dem in der Technik üblichen Verfahren abzentrifugiert und mehrmals gewaschen. Der Waschprozeß wurde so oft wiederholt, bis das Waschwasser mit spezifischen Reagentien verglichen mit dem Leitungswasser keine stärkere Reaktion auf das angewandte Schwermetall mehr zeigte. Beim Kupfer und Kobalt verwendeten wir zu diesem Zweck Rubeanwasserstoffsäure, beim Eisen Ferrocyankalium und beim Antimon Schwefelwasserstoff. Es war im allgemeinen schon nach der 2. Waschung kein deutlicher Unterschied mehr gegenüber dem Leitungswasser zu erkennen. Zur Sicherheit wurde eine 3. und 4. Waschung angeschlossen.

II. Kulturversuche.

Wie eingangs erwähnt, hatten wir uns die Aufgabe gestellt, eine möglichst große Speicherung von Schwermetallen in Pflanzenzellen zu erreichen. Wir gingen dabei von der Vorstellung aus, daß bei einer möglichst hohen Dosierung an Schwermetallsalzen auch eine gesteigerte Speicherung zu erwarten sei und begannen damit, zunächst die Schwermetallkonzentrationen festzustellen, bei denen die von uns verwendeten Pilze noch gut wachsen konnten. Wir berichten zunächst über Wuchsversuche mit *Mucor racemosus* auf Agar-Nährböden in PETRI-Schalen.

Bei Zugabe von je 1 g Schwermetallsalz/Liter Nährmedium (Nährboden I) war der Pilz auf einem Nährboden mit Nickel in seiner Entwicklung deutlich gehemmt. Lediglich unmittelbar an den Impf-

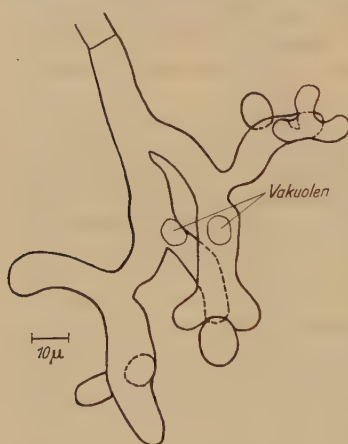


Abb. 1. Hyphen von *Mucor racemosus*, gewachsen auf Nährboden I mit 1 g $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ je Lit. 13 Tage alte Kultur.

stellen hatten sich einige wenige, winzige, kegelförmige Pilzkolonien von wenigen Millimetern Durchmesser gebildet. Während die Kontrollschalen bereits nach einigen Tagen mit einem dichten, feinen, anfangs weißlichen, später graugelblichen Mycelrasen bewachsen waren, zeigte der Pilz unter Einfluß des Nickels ein völlig verändertes Wuchsbild: An Stelle des typischen Luftmycels mit Sporangienträgern bildete sich eine ledrig harte, glänzende Mycelkruste. Mikroskopisch wurde eine völlig veränderte Struktur der Hyphen beobachtet. Im Gegensatz zu den Kontrollen oder auch zu den Kulturen auf kobalt- und kupferhaltigen Nährböden, bei denen die Hyphen gerade, nur wenig ver-

zweigte Schläuche darstellten, waren sie hier auf den doppelten und dreifachen Durchmesser angeschwollen und blumenkohlartig verzweigt (vgl. Abb. 1 u. 2).

Auch Kobalt rief in dieser Konzentration eine Hemmung des Pilzes hervor, die in einer verzögerten Wachstumsintensität zum Ausdruck kam. Im Gegensatz zum Nickel kam es aber zur Ausbildung des typischen Mycelrasens mit Sporangienträgern. Auffallend war, daß das auf Kobaltboden gewachsene Mycel schneeweiß war und die Myceldecke gefaltet und im ganzen dicker als bei der Kontrolle. Mikroskopisch zeigten die Hyphen wie Sporangien dieselbe Struktur wie die Kontrolle (vgl. Abb. 2 u. 3).

Auf dem Agar mit Kupfer war nur in den ersten Tagen eine deutliche Verzögerung des Pilzwachstums gegenüber der Kontrolle zu erkennen

Morphologisch waren keine Unterschiede im Wuchsbild festzustellen. Da von den Agarkulturen keine Meßergebnisse während der ersten 3 Tage zur Verfügung stehen, sei auf die völlig gleich verlaufenden Versuchsserien auf Gelatineböden verwiesen; als Durchschnittswerte der größten und kleinsten Durchmesser aus 15 bzw. 50 Kulturen wurde bei den Kontrollen 76:73 mm, bei den Kupferkulturen 55:51 mm gefunden. Schon nach 6 Tagen waren keine Wuchsunterschiede mehr feststellbar. Auch hier entsprach das mikroskopische Bild dem der Kontrolle.

In einer weiteren Serie verringerten wir die Zugabe an Schwermetallsalz auf je 0,1 g/Liter Nährmedium und kamen dabei zu folgenden Ergebnissen:

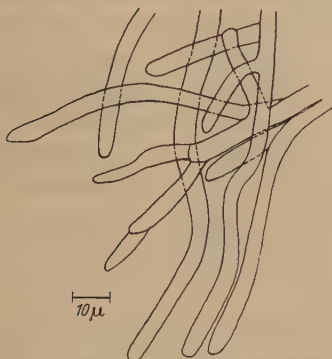


Abb. 2.

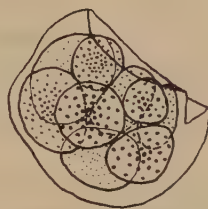


Abb. 3.

Abb. 2. Hyphen von *Mucor racemosus*, gewachsen auf Nährboden I mit Zugabe von 1 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ je Liter. 13 Tage alte Kultur. Alle Hyphen hellgelb gefärbt.

Abb. 3. Halbgeöffnetes Sporangium von *Mucor racemosus*, gewachsen auf Nährboden I mit Zugabe von 1 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ je Liter. 13 Tage alte Kultur. Sporangienhülle hellrosa, Sporen hellgelb gefärbt.

Bei den Kupfer-Nährböden zeigte sich auch hier nur in den ersten Tagen eine deutliche Wuchsverzögerung gegenüber der Kontrolle, eine erheblichere bei den Kobalt-Nährböden, die noch in den Meßergebnissen nach 6 Tagen zum Ausdruck kam, und die stärkste wiederum bei den Nickel-Kulturen. Doch zeigten diese, im Gegensatz zu der 10fach höheren Konzentration, keine Abweichungen in der Art des Wuchses. Auch mikroskopisch waren hier keine Besonderheiten festzustellen. Die Unterschiede in der Wuchsintensität sind in Tab. 1 mit dem nach 3 bzw. 6 bzw. 9 Tagen gemessenen größten und kleinsten Durchmesser der verschiedenen Pilzkulturen zusammengestellt.

Bei Kulturversuchen in flüssigen Nährmedien wurde neben *Mucor racemosus* auch *Bäckerhefe* verwendet. Zugabe von 1 g Kupfer- bzw. Kobalt- bzw. Nickelsalz/Liter Nährlösung verhinderte bei *Mucor racemosus* auf Nährlösung III überhaupt jegliches Wachstum, während in

der Kultur mit Eisenchlorid in dieser Konzentration nach 5 Tagen eine feine, geschlossene Myceldecke mit niedrigen Sporangienträgern zu erkennen war. Im Kontrollversuch war in der gleichen Zeit bereits ein dichter Mycelrasen mit reichlich Sporangien gewachsen. Mikroskopisch zeigten sich keine Besonderheiten bei dem Mycel aus Kulturen mit Eisenchlorid; auch die Keimfähigkeit der gebildeten Sporen war nicht beeinträchtigt.

Tabelle 1. *Mucor racemosus*. Wuchsversuch auf schwermetallhaltigen Agar-Nährböden in PETRI-Schalen von 10 cm Durchmesser.

Durchschnittswerte der größten und kleinsten Durchmesser von 3 bzw. 4 bzw. 5 Kulturen.

	1 g/Liter	0,1 g/Liter	
	nach 9 Tagen	nach 3 Tagen	nach 6 Tagen
Kontrolle	ganze Schale bewachsen	44:40 mm	ganze Schale bewachsen
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. .	ganze Schale bewachsen	35:34 mm	ganze Schale bewachsen
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.	30:27 mm	30:28 mm	77:64 mm
$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	nicht meßbar	14:10 mm	32:29 mm

Die Versuche mit Schwermetallsalz-Zusatz von 0,1 g/Liter wurden auch auf Antimon in Form von Solustibosan ausgedehnt. Weder mit Eisen noch mit Antimonzugabe zeigten sich nach 4 Tagen erkennbare Unterschiede gegenüber der Kontrolle, während die Kupferkulturen zwar gut, aber im ganzen doch nicht so üppig gewachsen waren wie die Kontrollen. Die Kobaltkulturen wiesen ein anderes Wuchsbild als die vorher beschriebenen Kulturen auf. Nach 4 Tagen hatte sich noch keine zusammenhängende Myceldecke gebildet, sondern nur sehr niedriges, spärliches Luftmycel. In den nickelhaltigen Kulturen war nach 4 Tagen noch kein Wachstum zu erkennen.

In Nährlösungen mit einem Zusatz von je 0,01 g Schwermetallsalz/Liter (Kupfersulfat, Kobaltnitrat, Nickelnitrat und Eisenchlorid) zeigte *Mucor* weder im Wuchsbild noch bei der mikroskopischen Prüfung Abweichungen gegenüber der Kontrolle. Die Beobachtungen sind in Tab. 2 kurz zusammengestellt.

In analoger Weise wie bei *Mucor racemosus* führten wir Wuchsversuche mit *Bäckerhefe* durch. Neben der bislang allein verwendeten Nährlösung III benutzten wir bei diesen Kulturen außerdem noch eine reine Malzextraktlösung (IV).

Zugabe von je 1 g Schwermetallsalz/Liter Nährlösung IV erwies sich bei den Versuchen mit Kupfer, Kobalt, Nickel und Eisen als deutlich

wachstumshemmend: In den ersten 3 Tagen fand überhaupt keine Vermehrung statt. Im Verlaufe von 4 Wochen entwickelten sich bei den Kobalt- und Eisenkulturen Hefezellen, die jedoch wesentlich kleiner als die des Kontrollmaterials waren. Bei den Nickel- und Kupferkulturen waren auch in diesem Zeitraum keine Hefezellen gewachsen. Um so erstaunlicher war der Einfluß von Antimon, das in Form von Brechweinstein, Fuadin und Solustibosan zugefügt wurde: Die Hefe entwickelte sich bei Zusatz von Solustibosan schon in den ersten 3 Tagen mindestens ebenso gut wie in den Kontrollkulturen, bei Zusatz von Brechweinstein und Fuadin sogar deutlich besser. Mikroskopisch wurden die Hefezellen in allen 3 Fällen etwas kleiner befunden als in den Kontrollkulturen. Die Hefe kam auch in Nährlösung III unter Zusatz von 1 g Brechweinstein/Liter genau so gut zur Entwicklung und bildete eine dichte Decke.

Tabelle 2. Wuchsstärke von *Mucor racemosus* in Nährlösungen mit verschiedenen Schwermetallzusätzen von verschiedener Konzentration.

	1 g/Liter nach 5 Tagen	0,1 g/Liter nach 4 Tagen	0,01 g/Liter nach 3 Tagen
Kontrolle	+++	+++	+++
Cu	—	++	+++
Fe	+	+++	+++
Co	—	+	+++
Ni	—	—	+++
Sb	nicht geprüft	+++	nicht geprüft

Bei zwei Versuchsserien mit Hefe in Nährlösung III mit einem Zusatz von 0,1 g Schwermetallsalz/Liter konnten in der ersten bei den Cu-, Co-, Ni-, Fe- und Sb-Kulturen (letztere nur mit Solustibosan) nach einer Kulturdauer von 16 Tagen sowohl in der Wuchsstärke als auch morphologisch, makroskopisch wie mikroskopisch keine Abweichungen gegenüber den Kontrollen beobachtet werden. Im wesentlichen decken sich hiermit die Beobachtungen in der zweiten Versuchsserie. Hier wuchs die Hefe in Kulturen mit Kupfer- und Kobaltzusatz in den ersten 7 Tagen zumindest ebenso stark wie die Kontrolle, bei den Antimonkulturen (in Form von Brechweinstein) aber deutlich besser als die Kontrolle. Die Nickelkulturen waren jedoch spärlicher bewachsen. Nach zwei Wochen hatten sich diese Unterschiede verwischt. Bei mikroskopischer Beobachtung fiel auf, daß nur in den Antimonkulturen die Zellen kleiner waren als in allen übrigen. Messungen konnten seinerzeit leider noch nicht vorgenommen werden.

Zusammenfassend läßt sich aus den geschilderten Versuchen der Schluß ziehen, daß die von uns benutzten Objekte, *Mucor racemosus* und

Saccharomyces cerevisiae, Schwermetallkonzentrationen von 0,1 g Salz/Liter gut vertragen, mit Ausnahme vielleicht des benutzten Nickelsalzes, das schon in dieser Konzentration eine erhebliche Wachstumsverzögerung hervorrief.

III. Untersuchungen über die Speicherung.

Daß ein dargebotenes Schwermetall von der Zelle assimiliert wurde, sucht man auf verschiedene Weise zu zeigen, je nach der Art der Fragestellung. Die Aschenanalysen an gewissen Organen von Tieren und höheren Pflanzen können aufschlußreich sein dann, wenn man sich für die Menge des gespeicherten Metalls in einem bestimmten Teil des Organismus interessiert. Mit Vorsicht sind hingegen solche Untersuchungen bei niederen Organismen zu beurteilen, die in einer mit dem Metall angereicherten Nährlösung gewachsen sind. Denn selbst, wenn ein gründlicher Waschprozeß vorangegangen ist, ist es möglich, daß das Schwermetall, im umgebenden Medium reichlich vorhanden, auf der Zelloberfläche niedergeschlagen und auch durch die Waschungen nicht entfernt worden ist. Derartiges wurde von uns z. B. bei Versuchen mit goldhaltigen Nährlösungen gefunden, auf deren Beschreibung wir aber in dieser Arbeit verzichten wollen.

Da uns hier aber gerade die Frage der Aufnahme ins Zellinnere interessierte, war es erwünscht zu versuchen, die Metalle, wenn möglich, im Zellinnern nachzuweisen. Wir versuchten daher, durch Anwendung bekannter Reagentien festzustellen, ob gegenüber den in Kontrollmedien gewachsenen Zellen eine vermehrte Aufnahme des zugesetzten Schwermetalls, z. B. von Eisen oder Kupfer, angenommen werden durfte, und zum anderen, aus der Verteilung der Färbung im Zellinnern auch etwas über den Ort der Speicherung zu ermitteln. Da uns andererseits die Menge der gespeicherten Metalle interessierte, wurden quantitative Aschenanalysen durchgeführt und dann, soweit möglich, mit den mikroskopischen Beobachtungen verglichen.

a. Mikroskopische Beobachtungen.

Bei *Mucor racemosus*, der auf Gelatine- oder Agarböden gewachsen war und reichlich Luftmycel gebildet hatte, gelang es ohne besondere Schwierigkeit, dieses Luftmycel mit Platinnadeln abzuziehen, ohne dabei in den Nährboden hineinzustoßen.

Das zum großen Teil aus Sporangien und Sporangienträgern bestehende Material wurde, sofern es sich um Kupfer-, Kobalt- oder Nickelversuche handelte, nach der Methode von OKAMOTO und UTAMURA mit Rubeanwasserstoffsäure gefärbt: Das Material wurde mit 96%igem Alkohol fixiert und für 24 Std im Thermostaten bei 36° C mit dem Reagens stehen gelassen, anschließend wieder in der Alkoholreihe entwässert. Das Reagens wurde folgendermaßen bereitet: 0,1 g Rubeanwasserstoffsäure (p. a. Merck) wurden in 100 cm³ Alkohol gelöst. Unmittelbar vor Gebrauch mischten wir 5 cm³ dieser Lösung mit 100 cm³ einer 10%igen, frisch bereiteten Natriumacetatlösung. Im Laufe unserer Arbeiten verschoben wir dieses Mischungsverhältnis mehr zu Gunsten der alkoholischen Rubeanwasserstoffsäurelösung.

Makroskopisch wurde beobachtet, daß sich sowohl das auf 1 g als auch das auf 0,1 g Schwermetallsalz/Liter Nährmedium gewachsene Pilzmaterial der Kupfer-Kulturen grün, der Kobalt-Kulturen gelb-braun und das der Nickel-Kulturen schmutzig-violett färbte, während das Kontrollmaterial ungefärbt blieb. Die mikroskopische Prüfung, in welchen Teilen der Zelle die Färbung am intensivsten war, führte bei diesem Objekt mit den uns zu Gebote stehenden Mitteln leider nicht zu eindeutigen Ergebnissen. Wohl ließ sich bei dem Plasma der Kupfer-Kulturen mit 1 g/Liter eine schwache Grünfärbung, bei dem der Kobalt-Kulturen eine schwache Gelbfärbung feststellen, aber es gelang nicht, irgendwelche Zusammenballungen nachzuweisen wie bei der Hefe (siehe unten). Die Abb. 4 und 5 zeigen Dauerzellen und Sporen aus dem Luftmycel von Kupferkulturen, die Abb. 2 und 3 Hyphen bzw. ein geöffnetes,

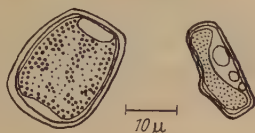


Abb. 4.

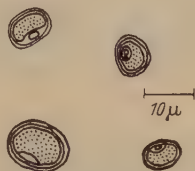


Abb. 5.

Abb. 4. Dauerzellen aus dem Luftmycel von *Mucor racemosus*, gewachsen auf Gelatinenährboden mit Zugabe von 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ je Liter. 9 Tage alte Kultur. Stärker gepunktete Stellen kräftig grün gefärbt, sonst hellgrün.

Abb. 5. Isolierte Sporen aus Sporangien von *Mucor racemosus*, gewachsen auf Gelatinenährboden mit Zugabe von 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ je Liter. 9 Tage alte Kultur. Gepunktete Stellen hellgrün gefärbt.

halbgeleertes Sporangium einer Kobalt-Kultur, jeweils in der Konzentration von 1 g Metallsalz/Liter. Die punktierten Bezirke der Abb. 3, 4 und 5 waren jeweils hellgrün bzw. hellgelb gefärbt. Bei den Nickelkulturen schien es uns hingegen meist so, als ob die Zellwände am intensivsten gefärbt waren; doch sind hier Täuschungen nicht ausgeschlossen. Immerhin gestatten diese Ergebnisse wohl den Schluß, daß die dargebotenen Schwermetalle tatsächlich in beträchtlicher Menge von den Zellen aufgenommen und, was Kobalt und Kupfer betrifft, auch im Plasma gespeichert werden.

Im folgenden sollen unsere Beobachtungen an Hefezellen, die wir aus den Großversuchen in der Nordd. Hefeindustrie während der Versuchsdauer in zweistündigem Abstand entnahmen, beschrieben werden.

Bei diesen Untersuchungen wurde wie folgt verfahren: Die dem Gärbottich entnommenen Proben wurden mit Hilfe einer Zentrifuge zwei- bis dreimal in Leitungswasser und zwei- bis dreimal mit in Glasgefäßen destilliertem Wasser gewaschen. Die letzten beiden Waschwasser wurden mit dem in Frage kommenden Schwermetallreagens kontrolliert. Nachweisbare Mengen waren bei diesem Vorgehen schon im vorletzten Waschwasser nicht mehr vorhanden.

Anschließend wurden die abzentrifugierten Zellen mit Farbreagentien behandelt, und zwar die Kupfer- und Kobalt-Hefen wie *Mucor* in der oben beschriebenen Weise mit Rubeanwasserstoffsäure, und sodann in Alkohol bis 70% entwässert. Von diesen in Alkohol suspendierten Zellen wurden Ausstrichpräparate gemacht, die, nachdem sie völlig lufttrocken waren, direkt mikroskopisch untersucht werden konnten. Dieselben Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Fixierung in Alkohol ausgelassen und das abzentrifugierte Material frisch in die Farblösung gebracht worden war.

Eine vergleichsweise makroskopische Betrachtung der zu verschiedenen Zeiten entnommenen frisch gefärbten Kupfer-Hefe-Proben in 70%igem Alkohol zeigte folgendes:

- 10 Uhr-Probe: kaum gefärbt, doch deutlich grüner als Kontrolle,
- 12 Uhr-Probe: deutliche blau-grüne Färbung,
- 14 Uhr-Probe: noch stärkere blau-grüne Färbung,
- 16 Uhr-Probe: deutliche blau-grüne Färbung,
- 18 Uhr-Probe: deutliche blau-grüne Färbung, aber schwächer als 16 Uhr-Probe.

Diese Feststellungen entsprechen den später durchgeführten quantitativen Untersuchungen, bei denen das Maximum der prozentualen Kupferspeicherung um 14 Uhr festgestellt wurde.



Abb. 6. Hefezellen aus dem Kupfergroßversuch. Entnahme 16 Uhr. Feinpunktierte Bezirke grau-grün, die Punkte kräftig grün gefärbt.

Bei der mikroskopischen Beobachtung erschien das Plasma der Zellen durchweg grau-grün, die Wände waren ungefärbt. Zwischen den Zellen waren keine Farbstoffniederschläge zu erkennen, so daß die makroskopisch sichtbaren Färbungen tatsächlich von Reaktionen in der Zelle stammen mußten. Intensivere Färbungen wurden in den 14-Uhr-, am meisten aber

in den 16-Uhr-Proben als grün gefärbte Körnchen im Plasma, mitunter, aber nicht als Regel, zirkulär um die Vacuolen angeordnet, beobachtet. Abb. 6 gibt ein Bild eines Ausstrichpräparates einer 16-Uhr-Hefe. Morphologische Besonderheiten bei der Speicherung ließen sich hier nicht feststellen.

Die Kobalt-Hefe-Proben zeigten makroskopisch folgendes:

- 10 Uhr-Probe: kaum gefärbt, aber deutlich gelber als Kontrolle,
- 12 Uhr-Probe: schwache, bräunlich-gelbe Färbung,
- 14 Uhr-Probe: kräftige, leuchtend gold-gelbe Färbung,
- 16 Uhr-Probe: fast so kräftig wie 14 Uhr-Probe, aber etwas rötlicher,
- 18 Uhr-Probe: etwa wie die 16 Uhr-Probe gefärbt.

Eine Abnahme der Färbung in den letzten Proben wie bei den Kupferversuchen war hier nicht feststellbar, bei makroskopischer Betrachtung auch keine ständige Zunahme, wie sie den späteren chemischen Analysen entsprochen hätte. Doch ergaben sich recht hübsche mikroskopische Bilder, die die ständige Zunahme der Speicherung recht deutlich erkennen

ließen, und die in den Abb. 7a—e dargestellt sind. Die Plasmakörper waren in 7a grau-gelblich, in 7b—e hellgelb gefärbt. Neben dieser diffusen Plasmafärbung traten nun noch von der 12-Uhr-Probe an in zunehmendem Maße braun gefärbte Körner im Plasma auf, die, soweit Vacuolen zu erkennen waren, mit Regelmäßigkeit in deren Peripherie lagen. Die auf dem optischen Schnitt in den Vacuolen erscheinenden Körner lagen an der Ober- oder Unterfläche der Vacuolen. Schon in den während dieses Gärversuches frisch entnommenen Proben war der Vacu-



Abb. 7a.

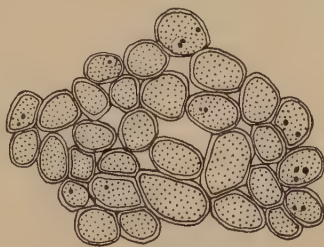


Abb. 7b.

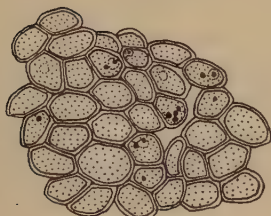


Abb. 7c.

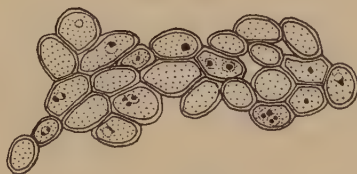


Abb. 7d.

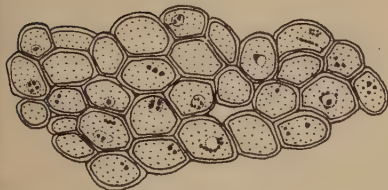


Abb. 7e.

Abb. 7a—e. Hefezellen aus dem Kobaltgroßversuch von 1949. Entnahme: a um 10 Uhr, b 12 Uhr, c 14 Uhr, d 16 Uhr, e 18 Uhr. Feinpunktierte Stellen in a grau-gelblich, in b—e hellgelb gefärbt. Starke Punkte stellen braune Körner dar. Helle Stellen = Vacuolen.

olenreichtum der Zellen im Gegensatz zu allen anderen Schwermetallversuchen aufgefallen, desgleichen auch durchweg in den Laboratoriumsversuchen mit Kobaltzusätzen. Wir möchten annehmen, nachdem wir auch die Speicherung des Kobalts in der Vacuolenperipherie sichtbar machen konnten, daß sich hier Vorgänge besonderer Art in der Zelle abspielen.

Wie bei *Mucor* haben wir in unseren Laboratoriumsversuchen leider auch bei der Hefe Nickel im Plasmakörper bisher nicht eindeutig nachweisen können. Wohl erhielten wir bei der Behandlung des gründlich gewaschenen Zellmaterials mit Rubeanwasserstoff eine schwache violette Färbung; aber ob diese auf Reaktionen

an den Zelloberflächen oder des Zellinnern beruhte, konnten wir nicht feststellen. Großversuche wurden mit diesem Metall nicht angestellt.

Desgleichen führten unsere Versuche, Eisen und Antimon in den Zellen nachzuweisen, zu keinem befriedigenden Ergebnis, so daß auch diese Versuche hier nicht besprochen werden sollen.

b. Quantitative Bestimmung.

Quantitative Bestimmungen führten wir bei den Schwermetallhefen durch, die in den Großversuchen in der Nordd. Hefeindustrie gewonnen worden waren; wir verfolgten die Veränderungen des Schwermetallgehaltes im Verlaufe der Gärung (vgl. Abb. 8).

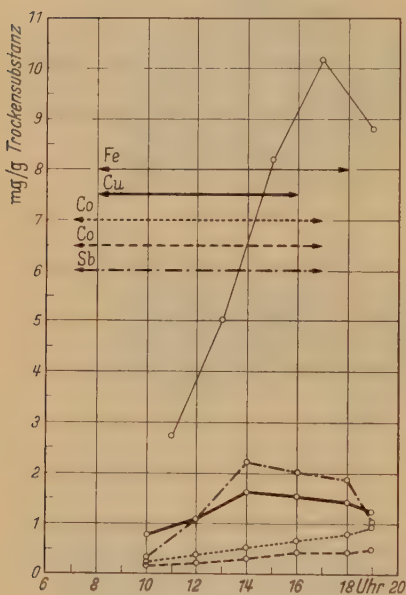


Abb. 8. Speicherung im zeitlichen Ablauf in den Hefegroßversuchen.

Zu diesem Zweck nahmen wir wieder im Abstand von jeweils 2 Std, wie bei den mikroskopischen Untersuchungen, Hefeproben ab, die von der Nährlösung durch Zentrifugieren befreit, 6 mal mit Aqua dest. gewaschen und darauf im Trockenschrank bei 100—105° C getrocknet wurden.

Kupfer-Hefe.

Die quantitative Bestimmung des Kupfers in der Kupfer-Hefe erfolgte auf gravimetrischem Wege durch Fällung mit Salicylaldoxim (nach EPHRAIM). Fällungsvorschrift: Die Kupfer-Hefe wird im KJELDAHL-Kolben mit rauchender HNO_3 und konz. H_2SO_4 verascht. Die klare mineral-saure Lösung wird mit NaOH bis zum Auftreten eines Niederschlages versetzt, den man durch Zugabe von CH_3COOH wieder löst. Man fällt nun das Kupfer quantitativ durch Zufügen von Salicylaldoxim unter kräftigem Rühren und filtriert durch einen Porzellanfertierteigel A I. Es wird dann solange mit kaltem Aqua dest. nachgewa-

schen, bis bei Zugabe von Eisenchlorid keine positive Reaktion auf das Reagens mehr erfolgt. Nach scharfem Absaugen trocknet man den Niederschlag im Trockenschrank bei 100—105° C bis zur Gewichtskonstanz.

Im Großversuch I vom 21. Juni 1949 (vgl. Abb. 8) betrug der Kupfergehalt der Stellhefe bei Beginn des Gärversuches 0,08 mg Cu/g Trockensubstanz; er war nach vierstündiger Versuchsdauer (10 Uhr) auf 0,74 mg angestiegen und erreichte nach 6 Std (12 Uhr) 1,0 mg. Das Maximum der Kupferaufnahme wurde um 14 Uhr mit 1,61 mg erreicht. Es folgte dann ein steter Abfall: Um 16 Uhr lag der Kupfergehalt bei 1,48 mg und um 18 Uhr bei 1,40 mg. Bei Abbruch des Gärversuches betrug der Kupfergehalt nur noch 1,24 mg Cu je g Trockensubstanz.

Kobalt-Hefe.

Auch bei der quantitativen Bestimmung des Kobaltgehaltes in den Kobalt-Hefen benutzten wir eine gravimetrische Bestimmungsmethode, und zwar mit α -Nitroso- β -naphthol als Fällungsreagens (MAYR-FEIGL). Analysenvorschrift: Die Kobalt-Hefe wird im KJELDAHL-Kolben mit rauchender Salpetersäure und konz. Schwefelsäure in üblicher Weise verascht. Nach Verdünnen mit Aqua dest. wird die schwachsaure Lösung mit 5 Tropfen Perhydrol versetzt und darauf 2n-Natronlauge bis zur Fällung eines Niederschlages von $\text{Co}(\text{OH})_3$ zugegeben. Man bringt dann den Niederschlag mit etwa 10 cm³ Eisessig unter schwachem Erwärmen zur Lösung und füllt mit siedend heißem Aqua dest. auf etwa 200 cm³ auf. Das Kobalt wird nun mit etwa 5—10 Tropfen α -Nitroso- β -naphthol in der Siedehitze gefällt. Nach Absetzen des Niederschlages filtriert man durch einen Porzellanfiltertiegel A I und wäscht mit heißer 33% iger Essigsäure mehrmals nach. Nach anschließendem Waschen mit fast siedend heißem Aqua dest. wird der Niederschlag bei 130° C zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Der Ablauf der Kobalt-Speicherung unterscheidet sich deutlich von dem des Kupfers (vgl. Abb. 8). Bei beiden Kobalt-Hefe-Großversuchen stieg der Kobaltgehalt bis zum Ende der Gärung kontinuierlich an. Im 1. Kobalt-Großversuch (23. Juni 1949) war der Kobaltgehalt der Hefe von 0,04 mg beim Beginn der Gärung nach 4 Std auf 0,18 mg angestiegen und hatte nach 6 Std 0,37 mg Co/g Trockensubstanz erreicht. Die Co-Bestimmungen der nun folgenden Proben zeigten einen steten Anstieg der Co-Menge: Nach 8 Std betrug der Co-Gehalt 0,49 mg, nach 10 Std 0,66 mg, nach 12 Std 0,75 mg und nach 13 Std 0,9 mg Co/g Trockensubstanz. Beim 2. Kobalt-Großversuch (6. Juni 1950) stieg der Co-Gehalt ebenfalls laufend an. Allerdings lagen die Werte unter denen des 1. Versuches, so daß die Kurve hier im ganzen flacher verlief. Der Co-Gehalt der abgenommenen Proben betrug: nach 4 Std 0,13 mg, nach 6 Std 0,21 mg, nach 8 Std 0,30 mg, nach 10 Std 0,39 mg, nach 12 Std 0,41 mg, bei Abbruch des Versuches 0,46 mg Co/g Trockensubstanz.

Antimon-Hefe.

Die Bestimmung des Antimongehaltes in der Antimonhefe (Großversuch vom 15. Juni 1950) wurde mit Hilfe der Papierstreifenmethode nach SANGER-BLACK durchgeführt. Ausführung der Bestimmung: Die Antimonhefe wird im KJELDAHL-Kolben mit rauchender Salpetersäure und konzentrierter Schwefelsäure verascht. Es ist dabei darauf zu achten, daß stets ein Überschuß an Oxydationsmitteln vorhanden ist, da sonst im Falle einer Verkohlung das vorhandene Sb V zu Sb III reduziert wird, das besonders bei Anwesenheit von Chlorid leicht flüchtige Verbindungen bildet. Nach Beendigung der Veraschung wird die restliche Salpetersäure durch Einblasen eines Luftstromes vertrieben und die schwefelsaure Antimonlösung in einen 100 ml-Meßkolben übergeführt. Man füllt darauf mit Aqua dest. auf 100 ml auf und legt eine genau abgemessene Menge der sauren Sb-Lösung zur Bestimmung vor. Bei dieser Methode wird das vorhandene Antimon durch Wasserstoffentwicklung in Antimon-Wasserstoff übergeführt, der mit dem Quecksilber der mit HgCl_2 -Lösung getränkten Papierstreifen eine Verbindung eingeht. Setzt man die Streifen dann Ammoniakdämpfen aus, so ist das Antimon in den Streifen

als schwarze Zone zu erkennen. Durch Vergleich der Länge der Farbzonen mit einer Skala, die mit Lösungen bekannten Sb-Gehaltes hergestellt wurde, läßt sich dann der Antimongehalt der Hefe feststellen.

Der Antimongehalt der Hefeproben ergab ähnliche Verhältnisse wie beim Kupfer-Hefe-Versuch (vgl. Abb. 8), nämlich ein Maximum im Sb-Gehalt um 14 Uhr (also nach 8 Std) und darauf einen Abfall bis zum Ende des Gärprozesses. Nach einer Gärzeit von 4 Std hatte die Hefe 0,29 mg Sb/g Trockensubstanz aufgenommen und erreichte nach 6 Std 1,05 mg. Der höchste Antimonwert wurde mit 2,2 mg nach 8 Std gefunden. Die restlichen Proben zeigten dann einen laufenden Abfall im Antimongehalt, und zwar enthielten die Proben um 16 Uhr (nach 10 Std) 2,0 mg und um 18 Uhr nur noch 1,84 mg. Der Antimongehalt der Hefe lag dann um 19 Uhr mit 1,008 mg Antimon/g Trockensubstanz etwa wieder in Höhe der 12 Uhr-Probe.

Eisen-Hefe.

Bei der Bestimmung des Eisengehaltes der Eisen-Hefen im Verlauf der Gärung (Großversuche vom 8. Juni 1950 und 20. Juni 1950) benutzten wir eine photometrische Methode, die darauf beruht, daß Sulfosalicylsäure mit Ferri- und Ferrosalzen in alkalischer Lösung eine gelbgefärbte Komplexverbindung bildet. Bestimmungsvorschrift: Die Eisen-Hefe wird in einem KJELDAHL-Kolben mit konz. Schwefelsäure und rauchender Salpetersäure verascht. Nach Beendigung der Veraschung entfernt man die vorhandene Schwefelsäure und die restliche Salpetersäure durch vorsichtiges Erwärmen im Sandbade unter gleichzeitigem Einblasen eines mäßigen Luftstromes. Der im KJELDAHL-Kolben verbliebene Rückstand wird darauf in 5 ml 25%iger HCl p. a. vollständig gelöst, in einen 100 ml-Meßkolben übergeführt und mit Aqua dest. auf etwa 50 ml aufgefüllt. Man versetzt den Inhalt nun mit 5 ml 1%iger Sulfosalicylsäure, mischt durch Umschwenken gut durch und fügt 10 ml 25%iges NH_4OH hinzu. Nach dem Auffüllen des Meßkolbens mit Wasser auf 100 ml und Durchmischen des Inhaltes photometriert man die Lösung in einer geschlossenen Kuvette $d = 6$ cm unter Benutzung des Filters 45 im Leitz-Photometer (Leifo-Druckschrift B/C.) Aus den Meßwerten einer Reihe von 10 Einzelmessungen wird das arithmetische Mittel gebildet und als Meßergebnis für die Auswertung benutzt.

Die Bestimmung des Fe-Gehaltes der einzelnen Hefeproben führten wir nur bei der Eisenchlorid-Hefe durch. Die Proben wurden nach einer Versuchsdauer von 5 Std (also ab 11 Uhr) 2stündlich abgenommen. Auch hier konnten wir wieder ein Maximum in der Speicherung feststellen, das aber erst bei 17 Uhr (also 11 Std nach Versuchsbeginn) lag. Der Fe-Gehalt veränderte sich während des Gärprozesses wie folgt: Um 11 Uhr 2,7 mg, um 13 Uhr 5,0 mg, um 15 Uhr 8,2 mg, um 17 Uhr 10,2 mg und um 19 Uhr 8,8 mg Fe/g Trockensubstanz (vgl. Abb. 8).

Die Eisencitrat-Hefe hatte bei Beendigung des Gärversuches einen Eisengehalt von 6,3 mg Fe/g Trockensubstanz, lag also im Endergebnis unter der Chlorid-Hefe. Der Speicherungsverlauf ist hier nicht analysiert worden.

IV. Besprechung der Ergebnisse.

Vergleichen wir die an unseren Objekten gewonnenen Ergebnisse mit dem uns aus der Literatur Bekanntgewordenen, so ergibt sich folgendes: Hinsichtlich Wachstumsförderung und Verträglichkeit der untersuchten Schwermetalle zeigten sich bei unseren Versuchen meistens die gleichen Größenordnungen, wie sie in zahlreichen Veröffentlichungen angegeben werden. Ein näheres Eingehen darauf würde hier zu weit führen, zumal die Wachstumseinflüsse zugeführter Schwermetalle von recht verschiedenen, hier nicht besonders untersuchten Faktoren abhängen. Deswegen ist auch die Festlegung einer optimalen bzw. noch erträglichen Schwermetallkonzentration als einer konstanten Größe gar nicht möglich. Daher sei nur auf solche Arbeiten näher eingegangen, die sich mit der Speicherung von Schwermetallen befassen.

Über den Nachweis des Kupfers in Pflanzen liegen umfangreiche Untersuchungen an höheren Pflanzen vor, die vor allem im Zusammenhang mit der Frage der Kupferarmut gewisser Kulturböden an landwirtschaftlichen Nutzpflanzen vorgenommen wurden.

Von Arbeiten an niederen Pflanzen sind besonders die Untersuchungen von SCHWARTZ u. STEINHARDT erwähnenswert, die sich bei *Aspergillus* auch mit der Frage des Ortes der Speicherung sowie der Art der chemischen Bindung des Kupfers beschäftigten. Sie glaubten, eine Kupferanreicherung im Mycel in den ersten Versuchstagen und ein späteres Absinken zu beobachten. Doch konnte die Trennung des im Mycel gespeicherten Kupfers von dem mit der Nährlösung dem Mycel außen anhaftenden anscheinend nicht ganz einwandfrei vorgenommen werden.

Ergebnisse über einen mikroskopischen Nachweis in Schimmelpilzen sind uns nicht bekannt. Unsere Untersuchungen an *Mucor racemosus* ergaben nun eine deutliche Kupferreaktion mit dem angewandten Farb-reagens, die bei den auf Kontrollböden gewachsenen Luftmycelien nicht beobachtet werden konnte. Daß es sich um außen anhaftendes Kupfer des Mediums handelte, kann hier mit Sicherheit verneint werden, da zu diesen Untersuchungen nur hochwachsende Luftmycelien verwandt wurden, die gar nicht in unmittelbarer Berührung mit dem Substrat standen. Die mikroskopische Beobachtung ließ mit Wahrscheinlichkeit darauf schließen, daß die Farbreaktion innerhalb des Plasmakörpers erfolgte. Auch unsere Versuche zur Erzielung kupferreicher Hefe ergaben mikroskopische Bilder, nach denen wir eine Speicherung des Kupfers im Plasmakörper mit Sicherheit annehmen möchten.

GUTSTEIN versuchte, an Hefe- und Bakterienzellen Schwermetalle mit verschiedenen Beizenfärbungen innerhalb der Zelle nachzuweisen und kam auf Grund seiner mikroskopischen Beobachtungen zu dem Schluß, daß Kupfer in den Hefezellen überwiegend in den äußeren Plasmapartien gespeichert wird. Doch handelte es sich hier um Hefezellen, die mit kupfersalzhaltigen Lösungen behandelt worden waren, und nicht um aus Wachstumsprozessen gewonnene Zellen.

Wir haben ebenfalls Versuche in dem von GUTSTEIN beschriebenen Sinne ausgeführt und fanden, daß Kupfersalze in die Zellen hineindiffundieren, aber auch genau so wieder ausgewaschen werden können. Es handelt sich um einen rein physikalischen Prozeß, der nichts mit dem Vorgang einer Speicherung durch die lebende Zelle zu tun hat; daß bei unseren Waschprozessen einiges in die Zelle diffundiertes, locker gebundenes Kupfer herausgewaschen wurde, das möglicherweise überwiegend in den äußeren Partien der Zelle haften blieb, erscheint vorstellbar. Wesentlich ist die Feststellung, daß erhebliche Mengen Kupfer im Innern der Hefezellen in nicht auswaschbarer Form gespeichert werden können.

Über die quantitativen Verhältnisse geben die Aschenanalysen Aufschluß. Wir fanden in der gewöhnlichen *Bäckerhefe* 0,08 mg Kupfer/g Trockensubstanz; dieser Gehalt stimmt gut mit Untersuchungen von WARBURG überein, der bei *Torula-Hefe* einen Gehalt von 0,07 mg Cu und bei einer *untergärigen Hefe* einen Gehalt von 0,09 mg Cu/g Trockensubstanz gefunden hatte. Im Verlauf des Großversuchs in der Nordd. Hefeindustrie zeigte sich nun, daß die Hefe bis zur 20fachen Menge dieses Ausgangsgehaltes speichern konnte. Daß dieser Gehalt im Verlaufe des weiteren Versuches wieder abnahm, muß vorläufig nur zur Kenntnis genommen werden, ohne daß nach diesem einmaligen Ergebnis irgend ein Schluß daraus gezogen werden dürfte.

Kobalt, dessen physiologische Bedeutung erst im Zusammenhang mit den Anämien des Menschen und der höheren Tiere erkannt wurde, wurde in früherer Zeit bei Pflanzenanalysen nur selten berücksichtigt. Neuestens versucht man nun, mit Hilfe von radioaktivem Kobalt die Aufnahme durch die Hefezelle zu verfolgen.

NICKERSON u. ZERAHN gelang es, durch Kultur in einem Medium mit radioaktivem Kobalt nach 17stündiger Kulturdauer in den abzentrifugierten, gewaschenen Hefezellen eine relativ starke Radioaktivität festzustellen. Sie fanden, daß die für 1 g Frischhefe errechnete Aktivität bis zum 670fachen derjenigen betrug, die im 1 cm³ Nährmedium am Ende des Versuches gemessen worden war.

Zur Beurteilung der Ergebnisse muß festgestellt werden, daß diese Autoren nur mit sehr geringen Kobalt-Konzentrationen im Medium, nämlich 21 bzw. 62,5 γ /Liter arbeiteten, während bei unseren Versuchen die Konzentration 30 mg Co/Liter Gärflüssigkeit betrug.

Dementsprechend waren auch die Speicherungsergebnisse recht gering verglichen mit den unsrigen. Errechnet man nach den veröffentlichten Versuchsergebnissen die maximal gespeicherte Kobaltmenge, so erhält man etwa 33,5 γ /g Trockensubstanz. Diese liegt somit in der Größenordnung unseres an Leerhefe gravimetrisch bestimmten Kobaltgehaltes von 40 γ /g Trockensubstanz. Während unseres 13stündigen Großversuchs stieg nun der Kobaltgehalt bis auf etwa das 20fache des Anfangsgehaltes ständig an. So muß angenommen werden, daß bei einer weiteren

zeitlichen Ausdehnung des Versuches möglicherweise noch höhere Speicherungswerte erzielt werden könnten. Bei einer Wiederholung des Versuches verlief der Anstieg gleichermaßen stetig, nur etwas langsamer.

Gegenüber diesem guten Speicherungsvermögen der Bäckerhefe fanden ANDERSSON-KOTTÖ u. HEVESY in ihren Untersuchungen mit radioaktivem Kobalt bei *Neurospora* nur eine Speicherung von 3,3 γ /g Trockensubstanz, obgleich die Kultur 5 Tage in einer Nährlösung lief, deren Kobaltgehalt in der gleichen Größenordnung wie in unseren Versuchen lag.

NICKERSON u. ZERAHN schließen aus Versuchen von RICHARDS u. TROUTMAN, die Kobalt in Hefe spektrographisch nicht nachweisen konnten, daß Kobalt zum Wachstum der Hefe nicht notwendig sei. Wie vorsichtig man mit solchen Schlüssen sein muß, ergibt sich schon daraus, daß wir in der Leerhefe meßbare Mengen Kobalt gefunden haben. Nachdem wir nun zeigen konnten, daß Hefe bei genügendem Angebot Kobalt in recht erheblichen Mengen speichert, erscheint es uns überhaupt schwer vorstellbar, eine kobaltfreie Hefe zu finden; denn, da das für jede Zelle notwendige Eisen gewöhnlich mit Kobaltspuren verunreinigt ist, wird man insbesondere auch nach den Untersuchungen von NICKERSON u. ZERAHN erwarten, daß Hefen schon die geringsten Spuren gierig an sich reißen werden. Hinzu kommt die bekannte Tatsache, daß Hefe die meisten B-Vitamine in nennenswerter Menge synthetisiert, und daß insbesondere auch das Vorkommen von B₁₂ zumindest für einige Hefearten bekannt ist.

NICKERSON u. ZERAHN sowie HUTNER u. a. vermuten, daß die Speicherung des Kobalts hauptsächlich an der Peripherie erfolge. Die Originalarbeit von WIAWI ist uns leider bisher nicht zugänglich gewesen. Unsere mikroskopischen Ergebnisse, die eindeutig auf eine Speicherung im Zellinnern schließen lassen, wurden in ihrem zeitlichen Ablauf beschrieben und durch Zeichnungen belegt. Ob die reichliche Vacuolen-Bildung auf eine spezifische Kobaltwirkung zurückzuführen ist, mag vorläufig nur als Vermutung geäußert werden, zumal die Anhäufung von stark tingierbaren Elementen an der Peripherie der Vacuolen recht auffällig ist.

Auch unsere Beobachtungen an *Mucor racemosus* deuten darauf hin, daß Kobalt im Plasma der Zellen, insbesondere auch der Sporen, gespeichert wird. Die Verhältnisse liegen hier genau wie beim Kupfer.

Nach ARDOINO ist das Nickel ein unerläßliches Element in höheren Pflanzen, das sich an Gewebeschnitten mikrochemisch nachweisen läßt. Auch BERTRAND u. MOKRAGNATZ fanden es in pflanzlichen Objekten. Über Speicherungsergebnisse nach erhöhtem Angebot sind uns keine Arbeiten bekannt. Daß unsere mikroskopischen Untersuchungen im Gegensatz zu den vorgenannten Versuchen mit Metallen keinen Beweis für eine Speicherung im Zellinnern erbrachten, wurde oben dargelegt. So darf vermutet werden, daß sich die beiden chemisch nahe verwandten Metalle Kobalt und Nickel physiologisch recht verschieden verhalten.

Begreiflicherweise sind Untersuchungen über das Vorkommen von Antimon in Pflanzenzellen selten gemacht worden.

Der Verbleib dieses Elementes im tierischen Organismus, insbesondere nach therapeutischer Verabfolgung, interessierte jedoch, und es konnte auch in der Leber nachgewiesen werden (HASSAN). In marinen Organismen wurde von botanischer und zoologischer Seite Antimon mehrmals nachgewiesen (NODDACK u. NODDACK, LAGRANGE u. TSCHAKIRIAN, CHAPMAN sowie CORNU), an höheren Pflanzen dann noch von ROSENTHALER u. BECK. Über das Vorkommen in Hefe, deren Affinität zu Arsen seit langem bekannt war, liegen unseres Wissens bisher keine Untersuchungen vor. KNAFFL-LENZ vermutete bei *Penicillium brevicaulis* die Bildung flüchtiger Antimonverbindungen durch den Pilz, mußte aber feststellen, daß solche nicht entstanden.

Quantitative Bestimmungen der Hefeproben aus dem Großversuch mit Brechweinstein ergaben ein Maximum des Antimongehaltes mit 2,2 mg/g Trockensubstanz nach 8stündiger Versuchsdauer. Dann nahm, wie beim Kupfer, der Sb-Gehalt der Hefe wieder ab. Auch hier kann nur das einmalige Versuchsergebnis als Faktum berichtet werden. Über den Ort der Speicherung an oder in der Zelle haben mikroskopische Untersuchungen leider keinen Aufschluß geben können. Daß mit unseren Analysen im wesentlichen außen an den Zellwänden anhaftende Antimon-Verbindungen aus der Kulturflüssigkeit erfaßt worden wären, erscheint schon nach den intensiven Waschprozessen äußerst unwahrscheinlich. Außerdem war der Zulauf der verschiedenen Schwermetalllösungen stets so geregelt worden, daß diese im Gärbottich nicht ausfielen. Auch der stetige Kurvenverlauf spricht gegen eine solche Annahme. Am Rande sei noch bemerkt, daß inzwischen vorgenommene Untersuchungen über die Natur der entstandenen Antimon-Verbindungen es auch wahrscheinlich machen, daß es sich hier um eine echte Assimilation seitens der lebenden Zelle handelt.

Im Gegensatz zu den vorgenannten Elementen ist das Vorhandensein des Eisens in jeder lebenden Zelle bekannt, und es interessierte von jeher die Menge des vorhandenen Eisens bei verschiedenen Organismengruppen, weiterhin auch die Art der Speicherung. Es würde zu weit führen, hier die umfangreiche Literatur über den Eisenstoffwechsel vieler Organismen heranzuziehen. Zum Vergleich seien nur einige Arbeiten erwähnt, die sich mit dem Eisengehalt der Hefe befassen.

An Hefenaschen hat WARBURG quantitative Bestimmungen gemacht. Er fand bei *Torula*-Reinkulturen 1×10^{-1} mg Fe/g Trockensubstanz, also einen Wert, der in derselben Größenordnung wie der des Kupfers lag. ELVEHJEM fand bei *Saccharomyces cerevisiae* einen Fe-Gehalt in Abhängigkeit von der in der Nährlösung dargebotenen Menge. In absolut eisenfreier Kultur bestimmte er nach 40- bzw. 156stündiger Kulturdauer den Eisengehalt mit 0,05 bzw. 0,06 mg/g Trockensubstanz. Schon bei dem geringen Eisenzusatz von 1 mg Fe/Liter Kulturflüssigkeit wies er den 4fachen Eisengehalt nach 40stündiger Kulturdauer nach.

Demgegenüber wurde in unserem Großversuch mit Ferrichlorid das Maximum des Eisengehaltes nach 9 Std mit 10 mg/g Trockensubstanz

bei einer Eisenkonzentration im Medium von 31 mg/Liter bestimmt. Es ist hiermit gezeigt worden, daß bei entsprechender Gestaltung der Außenbedingungen, insbesondere genügendem Angebot an löslichem Eisen, so viel von der Hefezelle gespeichert werden kann, daß 1% ihrer Trockensubstanz aus Eisen besteht. Wenn leider auch unsere Bemühungen, beweisende mikroskopische Bilder über die Fe-Speicherung in der Zelle mit verschiedenen Färbemethoden zu erhalten, zu keinem befriedigenden Ergebnis führten, so nehmen wir hier aus denselben Gründen wie beim Antimon an, daß das analytisch bestimmte Eisen einer echten Speicherung in der Zelle entspricht. Daß diese Menge um eine Größenordnung höher als die der anderen untersuchten Elemente liegt, erscheint uns nicht erstaunlich; ist doch das Eisen das „physiologischste“ unter den Schwermetallen.

V. Zusammenfassung.

1. *Bäckerhefe* konnte Kupfer und Kobalt bei der dargebotenen Konzentration von 38 bzw. 30 mg/Liter bis zu einer Menge speichern, die etwa das 20fache des Ausgangsgehaltes in der Hefe beträgt. Bei Kupfer stieg in unserem Versuch der Gehalt von 0,08 auf 1,6 mg Cu, bei Kobalt von 0,04 auf 0,8 mg Co/g Trockensubstanz.

2. Im zeitlichen Ablauf während der 13stündigen Versuchsdauer war beim Kupfer schon nach 8 Std das Maximum der prozentualen Speicherung erreicht, während beim Kobalt die Werte bis zum Versuchsende dauernd anstiegen.

3. Mit Hilfe eines bekannten Färbeverfahrens wurde die Speicherung dieser beiden Metalle im Zellplasma mikroskopisch beobachtet.

4. Mit derselben Methode gelang es, Kupfer und Kobalt im Plasma von *Mucor racemosus* festzustellen, während entsprechende mikroskopische Bilder für Nickel nicht zu erhalten waren.

5. Auch Antimon, als Brechweinstein der Nährlösung zugegeben, wurde von *Bäckerhefe* gespeichert; das Maximum war wie beim Kupfer schon nach 8stündiger Versuchsdauer mit 2,2 mg Sb/g Trockensubstanz erreicht.

6. Eisen, in dreiwertiger Form geboten, wurde bis zu einer maximalen Menge von 10 mg/g Trockensubstanz von der *Bäckerhefe* gespeichert; diese Menge stellt das 100fache der sonst in Hefe bestimmten Eisenwerte dar.

Für Eisen und Antimon konnten Färbemethoden, die einen einwandfreien Nachweis im Zellplasma bei unseren Untersuchungsobjekten gestatteten, bisher nicht gefunden werden.

Die Durchführung der Versuche in der Norddeutschen Hefeindustrie wurde ermöglicht durch das lebenswürdige Entgegenkommen von Herrn Dr. H. von LACROIX und seinen Mitarbeitern. Ihnen sei an dieser Stelle für ihre Unterstützung

noch einmal herzlich gedankt. — Bei den Laboratoriumsversuchen, insbesondere auch bei den Schwermetallbestimmungen, hat uns unser Chemotechniker, Herr ERICH MINUTH, jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Insbesondere wurde von ihm auch die Eisenbestimmungsmethode selbständig entwickelt. Ihm gebührt für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft ganz besonderer Dank.

Literatur.

- ANDERSSON-KOTTÖ, J., u. G. CH. HEVESY: *Biochemic. J.* **44**, 407 (1949). — ARDOINO, A.: *Mikrochemie* **8**, 40 (1930). — BERTRAND, G., u. M. MOKRAGNATZ: *C. r. Acad. Sci. Paris* **175**, 458 (1922). — CHAPMAN, C. A.: *Nature* **126**, 761 (1930). — CORNU, E.: *C. r. Acad. Sci. Paris* **168**, 513 (1919). — ELVEHJEM, C. A.: *J. of Biol. Chem.* **90**, 1125 (1931). — GUTSTEIN, M.: *Zbl. Bakter. I. Orig.* **104**, 410 (1927). — HASSAN, A.: *J. Egypt. Med. Ass.* **21**, 123 (1938); Ref. in *Chem. Zbl.* **2**, 1271 (1938). — HUTNER, S. H., u. Mitarb.: *Transact. N. Y. Academ. Sci.* **II**, 10 (1948). — KNAFFL-LENZ, E. v.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **72**, 224 (1913). — LAGRANGE, R. u. A. TSCHAKIRIAN: *C. r. Acad. Sci. Paris* **209**, 58 (1939). — NICKERSON, W. J., u. K. ZEHRAN: *Biochim. Biophys. Acta*, N. Y. **3**, 476 (1949). — NODDAK, J. u. W. NODDAK: *Ark. Zool.* **32 A**, Nr. 4, 32 (1939). — OKAMOTO, K., u. M. UTAMURA: *Acta Scholae med. Kioto* **20**, 573 (1936). — ROSENTHALER, L., u. G. BECK: *Pharmaceut. acta Helvet.* **11**, 186 (1936). — SCHWARTZ, W., u. H. STEINHARDT: *Arch. Mikrobiol.* **2**, 261 (1931); **4**, 301 (1933). — WARBURG, O.: *Biochem. Z.* **187**, 255 (1927). — WEISSBECKER, L.: *Kobalt als Spurenelement und Pharmakon. Beih. z. Medizin. Monatsschrift. Stuttgart* 1950. — WILMI, J. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, N. Y. **1**, 234 (1947).

(WILLIAM G. KERCKHOFF Laboratories of Biology, California Institute of Technology,
Pasadena, Calif.)

Studies in the phototaxis of *Rhodospirillum rubrum*.

I. Action spectrum, growth in green light, and WEBER Law adherence.

By

RODERICK K. CLAYTON*.

With 7 figures in the text.

(Eingegangen am 25. März 1953.)

Because of their striking pigmentation, their singular phototactic movements, and their unique photosynthetic metabolism, the purple bacteria (*Thiorhodaceae* and *Athiorhodaceae*) have been the subject of numerous studies in the past seventy years. Such studies have been aimed at an elucidation of the nature of the pigments, of the phototactic response, of the metabolism, and of the way in which these three are related.

The most extensively studied of these organisms, *Rhodospirillum rubrum*, is a corkscrew-shaped representative of the *Athiorhodaceae* which responds to an abrupt decrease in illumination by reversing its direction of swimming. Investigations of its photosynthetic metabolism (VAN NIEL), a variant of green plant photosynthesis, have thrown considerable light on the nature of the latter process; it is in this respect that the organism has provided its greatest utility in the past.

It is hoped that *Rh. rubrum* will be of value also, through studies of its phototactic response, in promoting our understanding of biological irritability (capacity of a living cell to respond to an environmental change). With this end in mind, the work described in this article consisted of some investigations into details of the phototactic process of *Rh. rubrum*.

I. Experiments undertaken.

Before outlining the experiments of the present investigation, let us review briefly our present state of knowledge of *Rh. rubrum*.

The bacterial pigments fall into two principal groups; a chlorophyllous substance (bacteriochlorophyll) and a complex of carotenoid pigments. In intact cells of *Rh. rubrum* the bacteriochlorophyll shows a pronounced absorption maximum at 875 m μ and smaller maxima at 800 and 590 m μ (in alcoholic extracts, in which the pigment is no longer conjugated to a protein, the infra-red maxima are shifted to 774 m μ). At least 95%

* Present address: U.S. Naval Postgraduate School, Monterey, Calif.

of the carotenoid group in *Rh. rubrum* consists of spirilloxanthin (POLGAR, VAN NIEL, a. ZECHMEISTER), a red pigment whose absorption maxima lie approximately at 550, 510, and 480 $m\mu$ in the intact cells. The maxima of the scarcer carotenoids, occurring in the blue and green, do not appear in absorption spectra of the intact cells, being masked by the maxima of the preponderant spirilloxanthin and by the effect of strong scattering. The carotenoids as well as the bacteriochlorophyll are conjugated to proteins (FRENCH, 1938, 1940).

The principal metabolic activity of *Rh. rubrum* is a reduction of CO_2 with the concomitant oxidation of any of a number of organic substances or other suitable hydrogen donors; simple organic acids and alcohols serve well as substrates. The rôle of the substrate as H donor is shown strikingly by the quantitative conversion of secondary alcohols to the corresponding ketones by some *Athiorhodaceae* (FOSTER). The oxidation of some substrates can yield CO_2 or higher intermediates which can in turn be metabolized to cell materials, making an external supply of carbonate unnecessary for growth. Light, when it is available to the purple bacteria, serves as a source of energy for the reduction of CO_2 . The *Athiorhodaceae* are not limited, however, to a photosynthetic metabolism; under aerobic conditions in darkness they are capable of reducing CO_2 , obtaining the necessary energy from the reduction of O_2 . With a newly isolated strain this capability must usually be developed by a period of adaptation to oxygen.

The phototactic response of *Rh. rubrum* has already been described as a reversal of swimming direction evoked by an abrupt decrease in the intensity of light impinging on the bacterium. An increase of intensity elicits no response, so that a spot of light acts as a trap for the bacteria: they are free to enter the spot, but they will probably reverse their direction of swimming when attempting to leave it. MOLISCH recognized the existence of accommodation in the phototactic response, observing that the effectiveness of a decrease of illumination in evoking a response becomes greater as the decrease is made more abrupt. SCHRAMMECK, investigating the smallest decrease of illumination which suffices to evoke a phototactic response, found that the liminally effective decrease amounts to 5% of the initial intensity for all values of the initial intensity ranging from 0.005 to 200 meter candles. This striking result has served as a key case in support of the so-called WEBER Law, which requires that the least perceptible change in an environmental factor be a constant fraction of the original intensity of the factor.

The question of what pigments in *Rh. rubrum* absorb light which is effective for the photosynthetic and phototactic processes can be settled, in principle, by comparing absorption spectra of the pigments with action spectra for the processes. Action spectra for photosynthesis, obtained

by FRENCH (1937) and by THOMAS (1950), consisted of measurements of the rate of CO_2 uptake, at a given light intensity, as a function of wave length. A phototactic action spectrum was obtained by MANTEN as follows: Onto a layer of bacterial culture was projected a field of illumination divided into two zones separated by a sharp boundary; one zone consisted of yellow-green filtered light of fixed intensity (I_g), while the other zone contained monochromatic light which could be adjusted in wave length and intensity. At a given wave length λ the intensity of the variable zone was adjusted to a value I_λ at which the bacteria did not respond phototactically when crossing the boundary (the two zones "appeared" equally "bright" to the bacteria); a plot of I_g/I_λ vs. λ revealed the phototactic effectiveness of light as a function of its wave length.

Table 1. *Maxima in absorption spectra and action spectra for photosynthesis and phototaxis of Rhodospirillum rubrum.*

Process	Wave lengths of greatest absorption or effectiveness (m μ)						
Absorption by bacteriochlorophyll	875	590					400
Absorption by carotenoids . .			550	510	480		
Photosynthesis (C. S. FRENCH 1937)	875	590					not meas.
Photosynthesis (J. B. THOMAS 1950)	not meas.	590	530	490	460		not meas.
Phototaxis (A. MANTEN 1948)	875	590	530	490	460	400	

Results of these investigations are shown in Table 1, in which absorption and action maxima are given. FRENCH found no photosynthetic activity on the part of the carotenoid pigments, the bacteriochlorophyll alone appearing to be active. His results are contradicted by those of THOMAS, who found photosynthetic action maxima in the region of carotenoid absorption as well as in the bacteriochlorophyll region. These maxima and the maxima in MANTEN's phototactic action spectrum do not, however, reflect absorption by the highly preponderant carotenoid spirilloxanthin; rather they suggest that only some of the scarcer carotenoids are active. In view of these discordant and unexpected results it was decided to perform another measurement of the phototactic action spectrum, employing a technique similar to MANTEN's but using monochromatic light of greater spectral purity. An investigation of possible sources of error in such action spectra was also conducted.

Unpublished experiments by Dr. W. ARNOLD, which involved the growth of *Rh. rubrum* in various parts of a spectrum, indicated that this organism is incapable of photosynthetic growth in light absorbed solely

by carotenoid pigments. This question was reexamined, using filtered light of intensity much greater than that which is easily obtained in the blue-green part of a broad spectrum.

Since the phototaxis of *Rh. rubrum* provides the most convincing support for the validity of the WEBER Law, and since this relationship between stimulus and response may be of fundamental significance in formulating a mechanism for biological irritability, it was decided to repeat the experiments of SCHRAMMECK referred to earlier in this section.

II. The phototactic action spectrum.

A. Instrumentation.

To gather more precise information on the phototactic activity of the carotenoid pigments of *Rh. rubrum*, a monochromator was constructed which yielded sufficiently intense light with spectral purity of 5 to 7.5 $m\mu$ (half-width); it is shown schematically in Fig. 1. The light source *I* (a 500 watt projection lamp) was imaged by the condensing lens L_1 at the entrance slit S_1 ; P_4 was an opaque reflecting

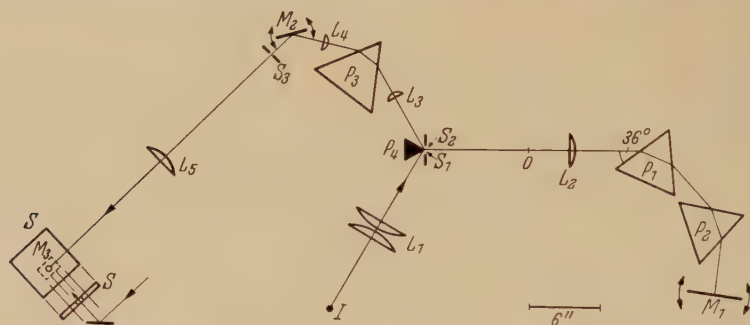


Fig. 1. Schematic diagram of Monochromator. Explanation in text.

wedge the apex of which formed one boundary of both entrance and exit slit. Having been reflected through S_1 the light was collimated by the lens L_2 and sent through the prisms P_1 and P_2 . The mirror M_1 returned the light through these prisms to L_2 ; this lens then focussed the chromatically dispersed beam in the form of a spectrum at the exit slit S_2 . The exit slit transmitted a portion of the spectrum; *O* was a black velvet obstacle which prevented a direct reflection of light from S_1 to S_2 via the surfaces of L_2 . Despite this precaution the monochromatic light emerging from S_2 was contaminated with enough stray light to require further purification; this was accomplished by the intervention of an extra dispersing stage consisting of the lenses L_3 and L_4 and the prism P_3 . The monochromatic light from S_2 was brought to a focus at a third slit S_3 via the mirror M_2 ; most of the stray light, having been dispersed into a spectrum, failed to pass the third slit. Finally the light passed through the lens L_5 and was reflected vertically by the mirror M_3 to the microscope stage *S*; L_6 formed an image of the slit S_3 in a layer of bacterial culture which rested on the stage. Wave length selection was accomplished by rotating M_1 ; the wave length was calibrated by replacing the source *I* with the output of a BECKMAN Spectrophotometer and with a mercury discharge tube.

A phototube and *AC* amplifier was used to measure the intensity of the strip of monochromatic light to which the bacteria were exposed (this intensity was varied by varying the voltage applied to the lamp). A removable mirror deflected the light emerging from L_5 to the cathode of a phototube, where the image of S_3 was formed. A ground glass plate in front of the phototube diffused the light over the cathode; without this precaution the response of the phototube was very sensitive to small movements of the image.

The intervention of a fan modulated the light into 60 cps pulses, permitting *AC* amplification. The pulsating photocurrent, of the order of 10^{-10} to 10^{-13} amperes, was passed through a high resistance in the grid circuit of a Victoreen electrometer triode; following a voltage amplification stage and a current amplification stage the output was rectified by germanium crystal diodes and measured by a *DC* microammeter. The circuit is shown in Fig. 2; the choice of three resistance values in the plate circuit of the first stage provided an approximately hundredfold range in amplification. The range of the microammeter was also extended by the use of shunting resistors, so that the instrument could be used for measuring photocurrents ranging from 10^{-13} to 10^{-9} amperes. The entire circuit, excepting the $6J5$ heater supply and the meter, was shielded with soft iron, light being admitted to the phototube through a window in the soft iron box. The phototube, 10^9 ohm resistor, and electrometer triode were mounted in a sealed dehydrated container

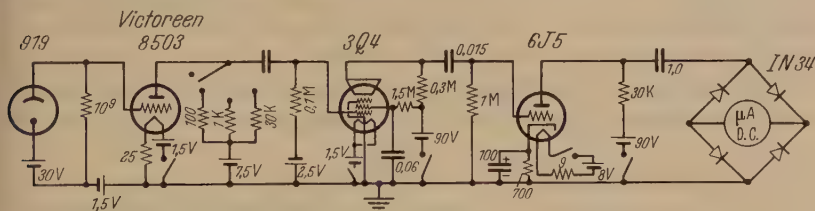


Fig. 2. Phototube-amplifier circuit. Capacitances in μf ; resistances in Ω .

to reduce current leakage caused by moisture. Microphonic noise, arising principally in the 3Q4, was eliminated effectively by packing this tube and the 6J5 in non-absorbent cotton (the absorbent variety is more inflammable).

The calibration of the phototube-amplifier involved three tasks: calibration of linearity (meter reading *vs.* incident flux), of relative spectral sensitivity, and of absolute sensitivity. The linearity was calibrated by observing the change in microammeter reading when the light incident on the phototube was reduced by one half; successive reductions were carried out over the entire useful range of the instrument. The spectral variation of sensitivity was calibrated by comparing the response with that of a thermocouple-galvanometer arrangement, using the spectral lines of mercury and sodium arcs to excite the two photometric devices. The absolute sensitivity of the thermocouple-galvanometer was estimated by observing the response to a 100 watt lamp and referring to the published efficiency of the lamp; the sensitivity of the phototube-amplifier at a given wave length was then estimated by comparing its response with the response of the thermocouple-galvanometer to monochromatic light. Meter readings with the phototube-amplifier were reproducible within 2% over periods of several hours; long-term variations in spectral sensitivity proved to be less than 5%.

The strain of *Rh. rubrum* employed in these investigations (strain *S-1*, VAN NIEL) was cultivated in the following medium: Sodium pyruvate 1.0%; yeast extract 0.3%; potassium phosphate buffer, pH 7.0 0.2%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%; MgCl_2

0.05%; CaCl_2 0.01%; NaHCO_3 0.01%; tap water 98.3%. Fully grown cultures were obtained in this medium from small inocula in about three days at 35° C. The cultures were grown under continuous illumination anaerobically (in completely filled glass-stoppered bottles).

B. Procedure.

The following observational procedure was adopted: A layer of dense bacterial culture 0.5 mm in thickness was mounted on a microscope slide, a circular glass spacer supporting the cover glass, and the whole sealed together with vaseline. Two strips of light were imaged in the plane of the culture. One, a control strip of white light, was kept at a fixed intensity of about four times the absolute threshold for phototaxis (the least intensity which causes a perceptible accumulation of bacteria in the light strip). The other strip, of monochromatic light, was applied with varying intensities. The two strips, surrounded by darkness, were imaged in the layer of bacterial culture for four minutes. Then the entire preparation was illuminated uniformly and view obliquely without magnification against a dark background; under these conditions the accumulation of bacteria where the light strips had been was easily seen. This procedure was repeated with different intensities in the monochromatic strip until the degrees of accumulation of bacteria in the two strips were observed to be equal; the intensity I_λ in the monochromatic

Table 2. *Explanation in text.*

Time	λ , m μ	Lamp volts	I_λ , quanta/ μ^2 msec	Relative taxis
1254	550	100	0.675	1
1301	560	92.5	0.675	$-\frac{1}{2}$
1308	560	97	0.80	1
1315	550	105	0.80	2
1321	550	95	0.575	0
1328	560	89	0.575	$-1\frac{1}{2}$
1335	560	92.5	0.675	$-\frac{1}{2}$
1342	550	90	0.48	-1
1349	560	84.5	0.48	-2
1355	560	101	0.91	2
1402	560	95	0.75	$\frac{1}{2}$
1408	550	103	0.75	2
1415	550	97.5	0.625	$\frac{1}{2}$ to 1
1422	560	91	0.625	-1
1429	560	86.5	0.525	-2
1435	550	92.5	0.525	$-\frac{1}{2}$ to -1
1442	550	95	0.575	0
1448	560	93.5	0.70	0

strip which matched the effect of the white strip was noted. The entire procedure was then repeated at another wave length λ' of monochromatic light; the ratio $I_\lambda/I_{\lambda'}$ expresses the relative effectiveness of the two colors of light in evoking phototaxis.

The data from a typical experiment are presented in Table 2. The first two columns are self-explanatory. In the next two columns the lamp voltage determines the intensity I_λ , expressed in quanta per square micron per millisecond, of the monochromatic strip the effect of which is compared with the control strip of white light. The fifth column expresses the relative degrees of accumulation of bacteria in the spaces where the two strips had been. The meanings of the numbers ranging from 2 to -2 in the fifth column can be tabulated as follows:

- 2—Accumulation in monochromatic strip much stronger than that in white strip.
- 1—Accumulation in monochromatic strip definitely stronger than that in white strip.
- $\frac{1}{2}$ —Accumulation in monochromatic strip just perceptibly stronger than that in white strip.
- 0—Accumulation in monochromatic strip equal to that in white strip.
- $-\frac{1}{2}$ —Accumulation in monochromatic strip just perceptibly weaker than that in white strip.
- 1—Accumulation in monochromatic strip definitely weaker than that in white strip.
- 2—Accumulation in monochromatic strip much weaker than that in white strip.

These indices of relative accumulation are not defined quantitatively, but in a null method of observation such as this the absolute values of deviations from the null need not be well known for precise judgment of the null itself. It was found helpful in locating the null and in judging the quality of the experiment to plot the accumulation index *vs.* the intensity of the monochromatic strip; this has been done in Fig. 3 for the data of Table 2. In this experiment the monochromatic intensities which matched the effect of the white strip were found to be 0.575 (at 550 m μ) and 0.71 (at 560 m μ); these intensities at their corresponding wave lengths were accordingly taken as equivalent in their ability to evoke phototaxis. The „equivalent intensity“ ratio I_{560}/I_{550} was then 0.71/0.575 or 1.24, and since it was known from earlier experiments that $I_{880}/I_{560} = 0.027$, the value $I_{880}/I_{550} = 0.027 \times 1.24 = 0.033$ could be entered in

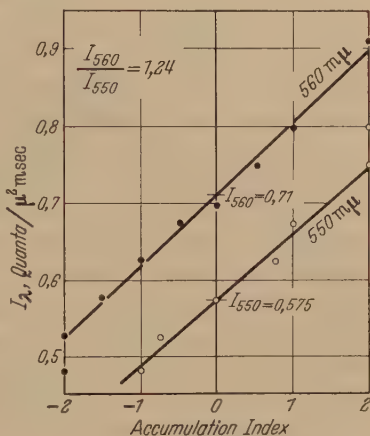


Fig. 3. Explanation in text.

the action spectrum. The complete action spectrum, a plot of I_{880}/I_{λ} vs. λ , is shown in Fig. 4 together with an absorption spectrum of living *Rh. rubrum*; for comparison the absorption and action spectra obtained by MANTEN are included in the figure.

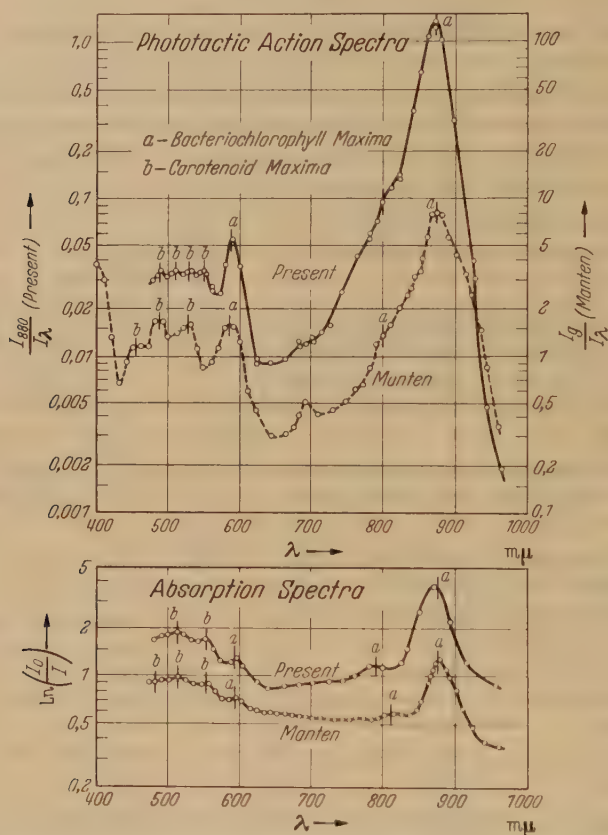


Fig. 4. Absorption spectra and phototactic action spectra of *Rhodospirillum rubrum*.

C. Discussion.

Above 570 $m\mu$ the present action spectrum is in good agreement with that obtained by MANTEN, showing the characteristic bacteriochlorophyll maxima at 590 and 870 $m\mu$ and smaller shoulders at 685 and perhaps at 800 $m\mu$.

Below 570 $m\mu$ the two action spectra bear almost no resemblance to each other. MANTEN's spectrum, showing pronounced maxima at 530, 490, and 460 $m\mu$ (the maximum at 400 $m\mu$ is due to bacteriochlorophyll) and minima at 550, 500, and 470 $m\mu$, suggests that spirilloxanthin does not absorb phototactically active light, but that one or more of the less

abundant carotenoids do. The relative activities of these less abundant carotenoid(s) and the bacteriochlorophyll are reflected in the relative heights of the various maxima; the maxima at 490 and 530 $m\mu$ (carotenoid) and at 590 $m\mu$ (bacteriochlorophyll) are seen to be about equal in height.

In contrast with MANTEN's action spectrum, the present action spectrum does show structure in the blue and green which suggests activity on the part of the spirilloxanthin. The maxima at 550 and 510 $m\mu$ coincide with spirilloxanthin absorption maxima; the agreement between the phototactic action maximum at 490 $m\mu$ and the spirilloxanthin absorption maximum at 480 $m\mu$ is more questionable. The maximum observed by MANTEN at 530 $m\mu$ appears in the present action spectrum, again suggesting activity on the part of the less abundant carotenoids. Indeed, the maximum in the action spectrum at 490 $m\mu$, observed also by MANTEN, may be associated with one of these scarcer carotenoids and may have masked a spirilloxanthin maximum at 480 $m\mu$.

The conflicting locations of maxima in the two action spectra are no more striking than the differences in relative heights of carotenoid and bacteriochlorophyll maxima. It will be recalled that in MANTEN's action spectrum the peaks at 490 and 530 $m\mu$, ascribed to activity on the part of scarcer carotenoids, are fully as high as the bacteriochlorophyll peak at 590 $m\mu$. In the present action spectrum the peak at 590 $m\mu$ rises much higher than any of the carotenoid maxima, even though some of these are associated with the abundant spirilloxanthin.

What can be said of the rôle of carotenoids in phototaxis, on the basis of these contradictory action spectra? MANTEN's spectrum suggests that spirilloxanthin is phototactically inert but that one or more scarcer carotenoids are quite active. The present spectrum, showing maxima at 490 and 530 $m\mu$ comparable in height to other maxima at 510 and 550 $m\mu$, suggests that spirilloxanthin is phototactically active but that one or more of the scarcer carotenoids are much more active in proportion to their concentration in the bacteria. If both spectra are to be taken seriously they must be reconciled by the assumption that the two strains of *Rh. rubrum* employed differed widely in the activities or in the relative concentrations of their pigments. Both strains (*S-1* and *4*) were isolated by VAN NIEL at Pacific Grove, California; their absorption spectra as shown in Fig. 4 indicate the presence of spirilloxanthin and bacteriochlorophyll in roughly the same relative amounts. The scarcer components of the carotenoid complex do not appear in these relatively crude absorption spectra, and their concentrations in the two strains of bacteria could conceivably differ by a large factor. Such a difference could cause exactly the variation in action spectra with which we are confronted. Had the strain *4* used by MANTEN been more deficient in

the scarcer carotenoids, the maxima in his action spectrum at 490 and 530 $m\mu$ might have been suppressed to a level far below the chlorophyll peak at 590 $m\mu$; at the same time the less pronounced maxima due to spirilloxanthin might have emerged from the masking influence of the other peaks. Conversely, an increase in the concentration of the scarcer carotenoids in strain *S-1* might have caused the present action spectrum to resemble that obtained by MANTEN.

The assumption, required in the foregoing interpretation, of low spirilloxanthin activity coupled with high activity on the part of much less preponderant carotenoids is not very satisfying. The possibility remains, of course, that either or both action spectra were vitiated by uncontrolled environmental influences; some of these were investigated in detail and will be discussed in the next paragraphs.

D. Sources of error.

The thinness of the bacterial preparation ensured the insignificance of sources of error arising from excessive absorption (screening, etc.). Reproducibility of data over long periods indicates that variations in the material and in the environment did not lead to serious error in the action spectrum. It is believed that the measurements were sufficiently precise so that the structure appearing in the action spectrum was in no case an artifact of scattered data; the difference between successive maxima and minima was always greater than the difference between duplicate measurements in the same region of the spectrum.

The possibility remains that throughout the action spectrum measurement a condition prevailed which tended to suppress or enhance the activity of one or more pigments; it was decided therefore that the influence of certain obvious environmental factors on the relative activities of the bacteriochlorophyll and the carotenoids should be explored. The factors investigated included temperature, oxygen concentration, culture age, and illumination in various aspects. The influence of changes in the composition of the culture medium should be investigated; this was not done.

The relative activities of the bacteriochlorophyll and the carotenoid systems were measured by a method similar to that employed by MANTEN in his action spectrum measurements. A divided field of illumination was projected on the bacterial preparation; one half consisted of light absorbed only by the bacteriochlorophyll and the other half, separated from the first by a sharp boundary, consisted of light absorbed only by the carotenoids. The relative intensities of the two halves were then adjusted so that no phototactic accumulations of bacteria were induced. This adjustment admitted of considerable precision; a variation of intensity

as little as 3% from the matching intensity would lead to a noticeable phototactic accumulation pattern along the boundary. The match of intensities having been established, its stability under the influence of certain environmental changes was examined; in this way the relative inactivation or sensitization of one pigment system or the other could be detected.

The instrument providing a sharply divided field of illumination will be described in Section IV in connection with investigations of the WEBER Law adherence. To isolate light in one half of the field which was absorbed solely by the bacteriochlorophyll, a Wratten No. 23A filter was used in conjunction with $\frac{1}{4}$ inch of 10% CuCl_2 in water; this combination transmitted light from about 570 to 700 $m\mu$. To isolate light in the other half which was absorbed only by the carotenoids, a Wratten No. 61 filter was used with the CuCl_2 filter just described; this combination passed light from about 500 to 570 $m\mu$.

The influence of culture age was investigated by comparing the matching intensities when applied to cultures of varying physiological age and to preparations which had been resting in the observation cell, in the dark, for lengths of time ranging from a few minutes to ten hours.

The influence of temperature was investigated at 10° C and at 25° C with the aid of a microthermostat built along the lines of one described by THOMAS and NIJENHUIS; this device was essentially a double-bottomed microscope slide through which water of controlled temperature could circulate. The room temperature remained between 25° C and 26° C throughout the period of these investigations; the temperature in the bacterial culture was calibrated against the temperature of the circulating water with the help of a six junction copper-constantan thermopile built for the purpose.

The influence of oxygen on the matching intensities in the divided field was observed both by introducing air bubbles into the observation cells and by noticing the results of accidental air leaks which occurred frequently (these microscopic leaks were easily detected by their attendant chemotactic accumulation patterns).

To see whether the relative sensitivities of the bacteriochlorophyll and carotenoid systems varied with the intensity of illumination, the intensity in each half of the divided field was raised or lowered by the same factor and the effect on the match was observed.

The influence of prior illumination with white light was examined using regimes ranging from three hours' dark adaptation to one hour of strong light adaptation (ten inches from 100 watt lamp).

Finally, the effect of simultaneous uniform illumination of the preparation during exposure to the divided field was investigated. This procedure amounted to augmenting the illumination in each half of the field by the same amount. The superimposed illumination was filtered and adjusted in intensity in such a way that it was equal to the light already present in one half or the other of the divided field. An examination of the stability of the intensity match under these conditions amounted to a test of the additivity, in their phototactic effects, of quantities of light absorbed by different pigment systems.

The results of all of the investigations just described were negative; the match of intensities which suppressed phototactic accumulations did not vary by more than 3% under any of the changing conditions which

were applied. The two pigment systems, bacteriochlorophyll and carotenoid, were either stable in their phototactic activity under these changes or were influenced in the same way and to the same degree; in either case no distorting influence on the action spectrum should be expected.

To interpret the present action spectrum and the one obtained by MANTEN we are left, then, with the possibility discussed before that the sensitivity in the blue region is largely due to one or more highly active minor carotenoids which vary markedly in concentration from one strain of *Rh. rubrum* to another. Alternative to this view is the possibility that one or both of the action spectra were vitiated by an effect which we have not considered. It should be remembered that measurements of action spectra, made by different investigators, do show considerable variation; experience has shown that one should be cautious in attaching great significance to such small maxima as are exhibited in the present action spectrum.

III. Growth in green light*.

We have mentioned that experiments on the growth of *Rh. rubrum* in green light absorbed by the carotenoid pigments (450 to 570 $m\mu$) have so far given negative results. The failure of this organism to grow in such light may have been due not to the relatively low effectiveness of the light but to its relatively low intensity under the experimental conditions employed (by „relatively“ we mean in comparison with near-infra-red light, about 875 $m\mu$). Accordingly the following growth experiment was conducted:

Four glass-stoppered bottles were filled completely with the medium described in Part B of Section II, inoculated with *Rh. rubrum*. One bottle was placed in the dark, the second in white light (about three feet from a 100 watt lamp), the third in filtered light absorbed almost exclusively by carotenoids (about 500 to 570 $m\mu$), and the fourth in filtered light absorbed almost solely by bacteriochlorophyll (about 570 to 700 $m\mu$). The two fields of filtered light were obtained by means of CuCl_2 and Wratten Filters 61 and 23a, as described in the preceding section. Their intensities were adjusted to phototactic equivalence with neutral filters.

The culture maintained in the dark showed no growth after three days. In this time the cultures in filtered light reached maximal development, growing at approximately equal rates. The culture kept in white light was fully developed at the end of one day.

We conclude that light absorbed by the carotenoid pigments of *Rh. rubrum* is capable of supporting photosynthetic growth of this organism, and that such light is as effective for growth as it is for phototaxis, when compared with light absorbed by bacteriochlorophyll.

* The work described in this section was performed at the Hopkins Marine Station, Pacific Grove, Calif., during the tenure of a Merck Postdoctoral Fellowship.

IV. WEBER Law adherence.

A. Method.

The importance of checking SCHRAMMECK's findings of the remarkable WEBER Law adherence displayed by the phototaxis of *Rh. rubrum* has been discussed in Section I. The essential experimental procedure used in performing this check was the same as that used by SCHRAMMECK. The bacteria, prepared for observation in the same manner as was done in the action spectrum measurements, were exposed to a divided field of illumination one half of which was slightly brighter than the other. Following a three minute exposure the preparation was photographed under uniform illumination to record the pattern of bacterial accumulation which persisted where the boundary of the divided field had been. The appearance of this accumulation pattern was thus studied in



a

(Threshold) Lower half darker.



b

Lower half darker.



c

Upper half darker.

Fig. 5. Phototactic accumulation of *Rhodospirillum rubrum* at the boundary of a divided field of illumination.

its dependence upon the intensities I_0 and I in the two halves of the field. It was found that below some value of $I_0 - I$ (hereafter denoted ΔI) there was no perceptible accumulation pattern. As ΔI was increased the first manifestation of phototaxis appeared in the form shown in Fig. 5a; the boundary dividing the halves of the split field was bordered on the darker side by a narrow zone of reduced bacterial density. As ΔI was increased further a zone of increased bacterial density became apparent on the brighter side of the boundary (Fig. 5b). Further increase in ΔI caused both zones to become wider and more pronounced until the extreme response was attained in which one half of the field was uniformly much denser than the other half (Fig. 5c). The criterion chosen in defining the phototactic threshold was the first positive appearance of an accumulation pattern.

In the course of a typical experiment the intensity in the left half of the field was maintained at $I_0 = 290 \text{ erg/cm}^2\text{sec}$ while the intensity in the other half was given successive values I , less than I_0 , until a definite phototactic accumulation pattern could be observed. The intensity in the right half was then set at $I_0 = 290 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec.}$ and the left half was attenuated to lower values I in successive stages until a phototactic pattern appeared. Photographs were taken of the bacterial response

to all settings of I_0 and I , and the two threshold values of $(I_0 - I)/I_0$ were observed and averaged. The data for this experiment are shown in Table 3. The two threshold values of $(I_0 - I)/I_0$ are seen to be 0.02 and 0.04 respectively. Averaging these, we say that $(\Delta I/I_0)_t$, the threshold value of $\Delta I/I_0$, equals 0.03 when I_0 equals 290 erg/cm²sec. The difference between the two values 0.02 and 0.04 probably arose because the two halves of the field were not perfectly matched when each was set at 290 erg/cm²sec; the averaging eliminated this source of error from the final result.

Table 3. *Discrimination threshold for the phototaxis of Rhodospirillum rubrum.*

I_0 , erg/cm ² sec	I , erg/cm ² sec	$(I_0 - I)/I_0$, Right half at I_0	$(I_0 - I)/I_0$, Left half at I_0	Phototaxis
290	290	0		—
290	287	0.01		—
290	284	0.02		+ (faint)
290	281	0.03		+
290	287		0.01	—
290	284		0.02	—
290	281		0.03	—
290	278		0.04	+ (faint)
290	275		0.05	+

The threshold having been determined for one value of I_0 , the entire process was repeated at another level of intensity. The average preparation could be used for four or five hours before its sensitivity began to deteriorate; in this time it was possible to cover three or four values of I_0 twice.

Adherence to the WEBER Law would require that the threshold value of $\Delta I/I_0$ be constant as I_0 is varied; the results of this investigation were summarized in a plot of $(\Delta I/I_0)_t$ against I_0 .

B. Instrumentation.

The optical arrangement providing a divided field of illumination is shown schematically in Fig. 6. It was adapted to the layout of the dismantled monochromator, so that the components I , L_1 , L_5 , M_3 , and S were the same as those shown in Fig. 1 and in the same locations (the 500 watt lamp, I , was replaced by a 750 watt lamp). After leaving L_1 the collimated beam was deflected in an appropriate direction by the mirror M_4 ; it was next sent through a cooling cell W through which water was circulated. After leaving the cell W the beam entered a filter housing F ; upon emerging from F it was divided into a right and a left half by a partition O . The right and left halves of the beam were rendered uniform by a ground glass plate contained in F , and their intensities would be reduced differentially by attenuating screens, also contained in F . The relative intensities of the two halves were controlled with greater delicacy by the intervention of two glass plates G ; each plate could be rotated from a position normal to the beam to a position which formed an angle of 17.5° with the direction of the beam. The resulting

transmission by either plate ranged smoothly from 86% (at normal incidence) to 59% (at 17.5° to the beam). At this point in the system two uniform beams of light had been formed which could be controlled accurately in intensity, independently of each other. It was desired next to bring these beams into juxtaposition, separated by a sharp boundary, at the microscope stage. This was done by means of the offset mirrors M ; their spacing was such that the central region dividing the two halves of the light beam was removed and the uniform portions of the divided beam were brought together. At the inner edge E of the forward mirror the two halves of the beam were in close contact with each other without appreciable gap or overlap; by imaging this edge at the microscope stage a sharp boundary was obtained separating the halves of a divided field of illumination.

The bacterial accumulation patterns were photographed with a Zeiss Contax camera which was mounted above the microscope stage.

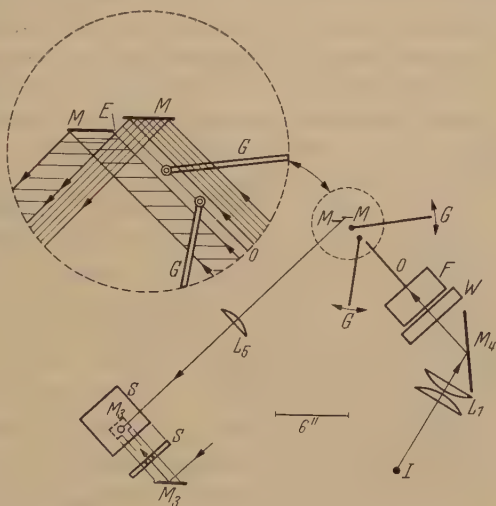


Fig. 6. Schematic diagram of system providing a divided field of illumination.

C. Observations and Discussion.

Before referring to a plot of $(\Delta I/I_0)_t$ against I_0 it would be well to discuss the manner in which the plot was obtained. In most cases the same bacterial preparation could be used for comparative threshold measurements at three or four values of I_0 . In the middle intensity range, from about 100 to 1000 erg/cm²sec, there was little difference in $(\Delta I/I_0)_t$ from one preparation to the next. At lower intensities, at which the threshold value of $\Delta I/I_0$ began to rise, greater differences in sensitivity between different preparations became apparent. These differences became most pronounced at the absolute threshold intensity, at which $(\Delta I/I_0)_t$ was equal to unity (half of the divided field was totally dark). This threshold intensity for discrimination between light and darkness varied about a mean value by a factor of about three from one preparation of bacteria to another. At intensities higher than the middle range the value of $(\Delta I/I_0)_t$ rose as light saturation set in; here again different preparations began to vary widely in their phototactic sensitivities. As in the case of the absolute threshold intensity, the intensity at which saturation began to appear varied by a factor of about three around a mean value for different preparations. It was observed that a high

value of the saturating intensity was correlated with a high value of the absolute threshold intensity; differences in sensitivity of the bacterial preparations appeared to be equivalent to changes in the scale of intensity, suggesting that the differences arose from variations in the quantum efficiency of the overall phototactic process.

In constructing a plot of $(\Delta I/I_0)_t$ vs. I_0 it was necessary to fit together the results of experiments on different preparations of bacteria having different phototactic sensitivities; the outcome of this construction is presented in Fig. 7 along with a plot of the results obtained by SCHRAMMECK. The data of three experiments in the middle intensity range were grouped together. A curve (solid line) drawn through these points was then extended through points representing two experiments, on pre-

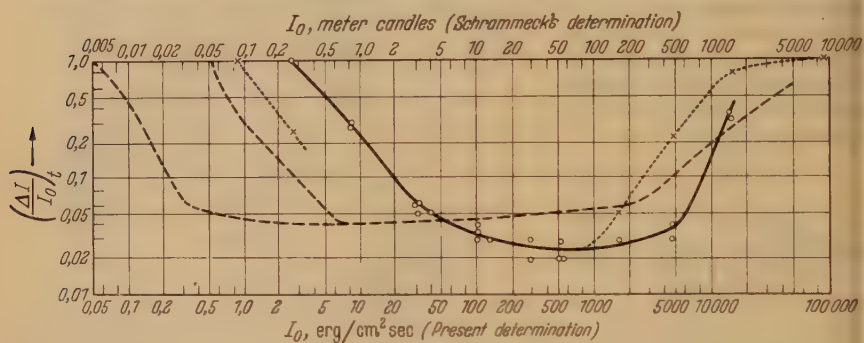


Fig. 7. Threshold of discrimination vs. intensity of illumination for the phototaxis of *Rhodospirillum rubrum*. — — SCHRAMMECK's determination. Present determination.

parations having approximately equal sensitivities, covering the lower range of intensities. The same curve was extended in the higher range of intensities through the data of two experiments which entered the saturating intensity region. The preparations used in these two experiments were observed to have the same absolute threshold, within about 20%, as the preparations used in the two experiments which covered the low intensity range. The complete curve, then, represents data on preparations having approximately equal sensitivities. An incomplete curve representing the data of one experiment is also plotted (dotted line). The preparation used in this experiment was unusually sensitive, having saturating and absolute threshold intensities which were lower by a factor of about 4 than the corresponding intensities for the average preparation.

The curve representing SCHRAMMECK's data (dashed line) shows two branches at the low intensity end; SCHRAMMECK actually obtained data for four branches of which these two represent the extremes of sensitivity. In the region of saturation two sets of data were obtained by

SCHRAMMECK, one for *Rhodospirillum rubrum* and the other for a *Chromatium* species. The results were in sufficiently close agreement to be represented by a single curve at the high-intensity end of the plot.

It is seen that the results of the present investigation differ from those of SCHRAMMECK in two ways: the range of I_0 over which the WEBER Law is followed is much smaller, and the sensitivity in the region of WEBER Law adherence is somewhat greater (as indicated by a lower threshold value of $\Delta I/I_0$).

There are three general ways in which a curve of this sort might be distorted:

1. Variations in the quantum efficiency of the overall phototactic process may occur. Such variations would be equivalent to changes in the scale of light intensity; in this case a logarithmic plot of $(\Delta I/I_0)_t$ vs. I_0 would be shifted along the I_0 axis without being distorted.

2. The observed phototactic sensitivity might be reduced, either through sluggish behavior of the bacteria or through poor observational technique. In this case the saturating intensity would be unaltered, but the absolute threshold intensity would be raised and the threshold, $(\Delta I/I_0)_t$, in the mid-region would be raised. Since the absolute threshold intensity would be brought closer to the saturating intensity, the range of WEBER Law adherence would be curtailed. Such a possibility can be dismissed in the present case, because the smaller range of WEBER Law adherence found by the author was not accompanied by a greater threshold in the mid-region of intensity.

3. The remaining possibility is that the saturating intensity, which depends upon the relative rates of „light“ and „dark“ processes within the bacteria, could vary greatly with the culture conditions and with the strain of bacteria employed. A reduced saturating intensity would curtail the range of WEBER Law adherence without altering the shape of the low-intensity end of the „WEBER Law curve“. We conclude that a lower saturating intensity was primarily responsible for the smaller range of adherence to the WEBER Law found in the present investigation, when compared with that found by SCHRAMMECK.

We are then led to the further conclusion that the present investigation did not reveal the greatest capacity for WEBER Law adherence latent in the phototactic response of *Rhodospirillum rubrum*.

It is tempting to speculate that in other cases than the present one (in the case of visual intensity discrimination by humans, for example) a close adherence to the WEBER Law might be masked by the early onset of saturating influences, and that under some conditions a determination of response vs. stimulating intensity might reveal a much higher saturating intensity and a more extensive WEBER Law adherence than has been observed to date.

On the other hand, the results of the present investigation on *Rh. rubrum* might be considered to weigh against the prevalence of WEBER Law adherence, contradicting as they do one of the few known cases of convincing adherence to this so-called law.

Should further experiments reveal a more widespread occurrence of close adherence to the WEBER Law, its significance as a fundamental property of an irritable cell would still be open to question. It may be that a simple mechanism causing WEBER Law adherence is embodied in the structure of a cell, and that its discovery would be of considerable value in elucidating the problem of irritability. On the other hand, the approximate WEBER Law adherence which has been observed in biological systems may be the result of a superposition of many physico-chemical factors which modify the relation between stimulus and response. Such a structure could develop as a result of many evolutionary modifications and could vary widely in its detailed nature from one type of living system to another.

Summary.

1. An action spectrum for the phototaxis of *Rhodospirillum rubrum* was obtained; it was found that the predominant carotenoid pigment of *Rh. rubrum*, spirilloxanthin, absorbs phototactically active light.

2. The photosynthetic growth of *Rh. rubrum* in light absorbed solely by carotenoid pigments was demonstrated.

3. The remarkable adherence to the WEBER Law reportedly displayed in the phototaxis of *Rh. rubrum* was reinvestigated; an adherence over a much smaller range of intensities was observed than had been reported earlier. The masking, under certain conditions, of a potentially extensive WEBER Law adherence was discussed.

Acknowledgments.

Thanks are due first to Prof. MAX DELBRÜCK for his helpful supervision of this investigation and for valuable suggestions and criticisms on basic matters. The author is grateful to Prof. R. B. KING and to Dr. E. PETTIT for their valuable assistance in the construction of optical equipment, and to Prof. C. B. VAN NIEL for his donation of the bacteria employed in this investigation.

Having held for three years an Atomic Energy Commission Fellowship in the Biological Sciences, the author wishes to express a grateful acknowledgment of the financial support which has attended this appointment.

References.

- FOSTER, J. W.: *J. Gen. Physiol.* **24**, 123 (1940). — FRENCH, C. S.: *J. Gen. Physiol.* **21**, 71 (1937); **23**, 469, 483 (1940); *Science* **88**, 60 (1938). — MANTEN, A.: *Ant. van Leeuw.* **14**, 65 (1948). — MOLISCH, H.: *Die Purpurbakterien nach neuen Untersuchungen*. Jena: G. Fischer 1907. — VAN NIEL, C. B.: *American Scientist* **37**, 371 (1949). — POLGAR, A., C. B. VAN NIEL and L. ZECHMEISTER: *Arch. of Biochem.* **5**, 243 (1944). — SCHRAMMECK, J.: *Beitr. z. Biol. d. Pflanze* **22**, 314 (1934). — THOMAS, J. B.: *Biochim. et Biophys. Acta* **5**, 186 (1950). — THOMAS, J. B., and L. E. NIJENHUIS: *Biochim. et Biophys. Acta* **6**, 317 (1950).

(Hopkins Marine Station, Pacific Grove, Calif.)

Studies in the phototaxis of *Rhodospirillum rubrum*.

II. The relation between phototaxis and photosynthesis.

By

RODERICK K. CLAYTON*.

With 14 figures in the text.

(Eingegangen am 25. März 1953.)

The idea has been advanced by MANTEN that the phototaxis of the purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* (a reversal of swimming direction resulting from an abrupt decrease in illumination) is dependent upon a sudden reduction in the rate of its photosynthetic metabolism. This hypothesis was supported by the similarity between the action spectrum for photosynthesis, obtained by THOMAS, and that for phototaxis, determined by MANTEN. Moreover, THOMAS and NIJENHUIS have reported that the saturating light intensities for photosynthesis and for phototaxis are equal and vary in the same way under the influence of cyanide and of urethane.

A prominent feature of phototaxis is accommodation: an abrupt decrease in light intensity is more likely to elicit a response than is a gradual decrease of the same magnitude. It is not probable, therefore, that the phototactic response depends simply upon a certain change in the "steady-state" rate of photosynthesis. To account for accommodation we should suppose, rather, that phototaxis is associated with a transient disturbance in the photosynthetic process, and that this transient fluctuation must reach some threshold magnitude to evoke a response. Such a transient effect can occur at light intensities higher than that which corresponds to saturation for photosynthesis, as based on measurements of the steady rate. MANTEN's hypothesis, when interpreted in this way, does not require that the saturating light intensities for phototaxis and for photosynthesis be equal.

Although unaware of the foregoing considerations at the onset of this investigation, the author felt that a more thorough study of these saturating intensities was desirable. The one plot of photosynthetic rate vs. light intensity published by THOMAS and NIJENHUIS indicates that complete saturation was not attained at the highest intensity employed. Moreover, no mention was made of any correction for the attenuation of

* Present address: U.S. Naval Postgraduate School, Monterey, Calif.

light in penetrating the bacterial suspension. The data given by THOMAS and NIJENHUIS on phototactic saturation show an abrupt break at a well-defined saturating intensity. On the other hand, the published curve of photosynthetic rate *vs.* light intensity levels off gradually at the higher intensities with no abrupt break. The inference is that different intensities prevailed in different parts of the bacterial suspension, and that the mean intensity was appreciably less than the incident intensity.

The present article describes simultaneous measurements of the saturating intensities for photosynthesis and for phototaxis of *Rh. rubrum*, made with the intention of gathering more significant data on the question. It was desired, furthermore, to investigate the influences of different media on these saturating intensities. It was found by VAN NIEL (1941) that the photosynthetic rate of *Rh. rubrum* in the presence of both acetate and propionate can, under special circumstances, be roughly the sum of the individual rates with acetate and with propionate. This observation, made under conditions of light saturation, indicated that the two substrates were oxidized through independent enzyme systems, and that the reactions of these substrates with their associated enzymes were the rate-limiting processes. It could be expected, therefore, that the saturating intensity for photosynthesis with the mixture of substrates would be the sum of the individual saturating intensities. If the photosynthetic and phototactic processes are related in the intimate manner proposed by MANTEN, one might observe corresponding effects in the saturating intensity for phototaxis.

I. Instrumentation and methods.

A. Culture and experimental conditions of the bacteria.

Rhodospirillum rubrum (Strain S-1, VAN NIEL) was maintained in liquid culture in the following medium: Yeast autolysate¹ 10%; sodium pyruvate 0.3%; $\text{KH}_2/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.01 M (pH 6.8); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%; MgCl_2 0.05%; CaCl_2 0.01%; tap water balance.

The cultures were grown at about 25°C, under continuous illumination, in cotton-plugged florence flasks filled to the neck (this strain of *Rh. rubrum* is notably tolerant toward oxygen). In some experiments these cultures were used without further treatment; in others the bacteria were centrifuged and resuspended in the above medium or in dilutions thereof.

In still other cases the bacteria were subjected to the following regime: A culture grown for 24 hours in the manner described above was centrifuged and the cells were resuspended in an acetate-mineral medium, where growth was continued for 24 hours: Sodium acetate 0.005 M; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%; MgCl_2 0.05%; CaCl_2 0.01%; NaHCO_3 0.03%; $\text{KH}_2/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.02 M (pH 6.8).

After this the cells were centrifuged and resuspended in a weakly buffered substrate-mineral medium, with which the experiments were conducted: Sodium

¹ Prepared according to the directions of S. ORLA JENSEN from commercial baker's yeast; 10% yeast autolysate is roughly equivalent to 1% powdered yeast extract.

propionate 0.004 M; Sodium acetate 0.005 M (one or both); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%; MgCl_2 0.05%; CaCl_2 0.01%; NaHCO_3 0.03%; $\text{KH}_2/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.00067 M (ph 6.8); HCl 0.001 M.

It was found that the ability of *Rh. rubrum* to utilize acetate and propionate varied markedly from one subculture to another, being suppressed by growth in yeast autolysate plus pyruvate and recovering during exposure to acetate. The sodium pyruvate was used in conjunction with yeast autolysate because of its remarkable influence in stabilizing the pH . Cultures grown in 10% yeast autolysate alone cause a change in pH of the medium from about 7.0 to about 8.5. With 0.3% sodium pyruvate added the pH changes by not more than 0.2 units; usually from 7.0 to about 6.8. This stabilizing influence permitted greater development of the cultures and caused the members of fully grown cultures to be more active photo-tactically.

B. Instrumentation.

Phototaxis of *Rh. rubrum* was observed by imaging a strip of light, surrounded by a darker field, in the plane of a suspension of the bacteria mounted on a microscope slide. A glass ring supported a cover glass on the slide, providing a disc-shaped cavity 1 cm in diameter and 0.5 mm thick for the bacterial suspension. Vaseline was used to seal the slide, ring, and cover glass together. Phototactic accumulation of bacteria could easily be seen, when present, as a strip of greater bacterial density after three minutes' exposure to the strip of light.

The instrument which imaged a strip of light in the bacterial suspension is shown schematically, in vertical cross section, in Fig. 1. Light from a 500 watt projection lamp *I* was collimated by a condensing lens L_1 and sent through one or more attenuators *A* (ground glass plates, uniformly exposed photographic plates, and semi-transparent mirrors). The light then passed through *Q*, which was a semi-transparent mirror with the aluminum etched away at a central strip. This central strip transmitted 25% more light than the surrounding area. The lens L_2 , an EASTMAN-Aero-Ektar, imaged *Q* at *B*, the plane of the bacterial suspension, via the water cell *W*, the mirror *M*, and the stage *S*. Thus a strip of light, 25% brighter than the surrounding area, was imaged in the bacterial suspension. The intensity of the entire field of illumination was varied by the use of different combinations of attenuators *A*; phototactic saturation was determined by raising the intensity until phototactic accumulation of *Rh. rubrum* failed to occur.

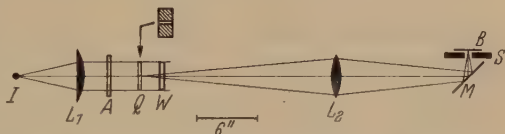


Fig. 1. Schematic diagram of optical system for phototaxis observations.

It will be remembered that the purpose of this investigation was a comparison, under specific environmental conditions, of the saturating light intensities for phototaxis and for photosynthesis. Consequently it was essential that photosynthesis measurements be conducted in an environment identical to that prevailing in phototaxis observations; *i. e.*, in a chamber completely filled with a portion of the same bacterial suspension at the same temperature. It was desired also to use a thin chamber with flat bottom and top, so that the intensity of light could be determined accurately. These requirements precluded the use of WARBURG manometry and led to the design shown in Fig. 2; ten such units were built, to permit simultaneous measurements at different light intensities.

A 100 watt lamp, *a*, was covered by a can, *b*, with a hole drilled in its top; the size of this hole determined the intensity of light reaching the bacteria. After

emerging from the hole, the light was diffused by a ground glass plate, *c*, and passed through a large hole in a can, *d*, which supported the system above it. A ground glass plate, *e*, diffused the light further; an inverted Petri dish, *f*, prevented condensation of moisture on a crystallizing dish, *g*, which served as a water bath. In this bath a CARRELL tissue culture vessel, *i*, which held the bacterial suspension, was supported on a coarse wire screen, *h*. A mirror, *j*, above the vessel improved the

uniformity of light throughout the suspension of bacteria. Water, entering the bath at *k* and leaving it at *l*, was circulated at such a rate that its temperature was equal to the room temperature (the colder incoming water was warmed by the lamp). By means of this arrangement the bacteria could be made to photosynthesize at well known intensities of illumination, under conditions essentially identical to those prevailing in the phototaxis measurements.

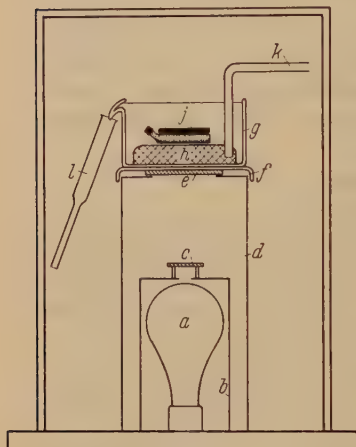


Fig. 2. Schematic diagram of illuminated bath for photosynthesis measurements.

C. Experimental procedures.

In determining the saturating intensity for phototaxis, a preparation of *Rh. rubrum* was exposed for three minutes to a field of illumination containing a central strip 25% brighter than the surrounding area, as described earlier. The preparation was then examined with the unaided eye, and the pattern of phototactic accumulation was noted. This process was repeated at successively higher intensities of the bright strip and its surrounding field until saturation was attained, as indicated by a failure of the phototactic accumulation pattern to develop. In recording the degree of phototactic accumulation a subjective index was used which ranged from zero (no accumulation) to ten (maximum accumulation). This method of recording was satisfactory because saturation appeared very abruptly as the intensity was raised.

The saturating intensity for photosynthesis was found by determining the rates of photosynthesis at different intensities of illumination. Photosynthetic rates were estimated by two different methods:

1. The increase in density of a suspension of bacteria was followed turbidimetrically; the "growth rate" thus determined was assumed, during exponential growth, to be proportional to the rate of photosynthesis. This method was used with bacteria suspended in yeast autolysate-pyruvate medium, and in one experiment with cells suspended

in acetate and in propionate media. In general the growth in acetate and in propionate media was too slow and irregular to permit accurate estimations of photosynthetic rate.

2. The decomposition of acetate or of propionate by the bacteria was determined, the rate of utilization of substrate being taken as proportional to the photosynthetic rate. When one mole of sodium acetate or propionate is decomposed, one mole of free alkali is released, the substrate being removed as acetic or propionic acid. In WARBURG manometry, approximately one mole of CO_2 is then absorbed from the gas phase; in our experiments the rise in alkalinity of the suspension was measured and correlated with the amount of substrate decomposed.

The following procedure was used in turbidimetric experiments: Ten tissue culture vessels were filled with a suspension of bacteria, prepared as described in part A of this section; the preparations for measuring phototaxis were set up at the same time, using the same suspension. The vessels, completely filled and stoppered, were placed in their individual baths, exposed to different intensities of illumination. After four hours the turbidity of each preparation was measured, using a KLETT-SUMMERSON Colorimeter with green filter. To determine whether or not the requirement of exponential growth was fulfilled, the turbidity of one preparation was measured at intervals of one hour; this sample was kept at the highest intensity of illumination used in the experiment.

Experiments involving the measurement of alkalinity were performed as follows: Ten tissue culture vessels were filled with a suspension of bacteria in weakly buffered acetate or propionate medium. All ten vessels were first kept in daylight until they showed a definite pH rise, as measured with a BECKMAN pH Meter. The vessels were then placed in their baths, at different light intensities, and the pH was measured again after one or two hours. After this the vessels were again placed in daylight for 30 min and the pH was measured once more, to check on the continuing activity of each preparation. The chief difficulty in this type of measurement is the rapid exchange of CO_2 with the air during measurements; with suitable standardization the method became remarkably sensitive and precise, permitting reliable measurements of photosynthetic rate *vs.* light intensity.

II. Theoretical considerations and calibrations.

A. The shape of the saturation curve.

We shall assume that the rate of photosynthesis and of growth (when the cells are growing exponentially) is directly proportional to the light intensity¹ below a critical value I_s (the saturating intensity), and is constant at all intensities greater

¹ By light intensity we mean an integration of contributions of all wave lengths present, weighted according to the photosynthetic effectiveness at each wave length.

than I_s . If there were no appreciable attenuation of light in penetrating a bacterial culture, its exponential growth would follow the equations

$$\begin{cases} d\rho/dt = k\rho I & (I \leq I_s) \\ d\rho/dt = k\rho I_s & (I \geq I_s) \end{cases} \quad (1)$$

where ρ is the density of the culture (cell material *per unit volume*). Integration of equation (1) gives

$$\begin{cases} \text{Ln } (\rho/\rho_0) = ktI & (I \leq I_s) \\ \text{Ln } (\rho/\rho_0) = ktI_s & (I \geq I_s) \end{cases} \quad (2a)$$

$$\begin{cases} \text{Ln } (\rho/\rho_0) = ktI_s & (I \geq I_s) \end{cases} \quad (2b)$$

where ρ_0 is the cell density at time $t = 0$. If growth were inappreciable during the time of observation, the rate of substrate utilization would follow the equations

$$Q_0 - Q = k'tI \quad (I \leq I_s) \quad (3a)$$

$$Q_0 - Q = k'tI_s \quad (I \geq I_s) \quad (3b)$$

where Q_0 and Q are the concentrations of substrate at time zero and at time t . Saturation curves with negligible attenuation of light would then have the form shown in Fig. 3.

Consider now the case in which light is attenuated as it penetrates the suspension of bacteria. In this case measurements of photosynthetic rate give a mean value of the rates for the individual bacteria. If the intensity of light incident on the culture is below saturation, the rate of photosynthesis for each bacterium is proportional to the local intensity and the mean rate is proportional to the mean intensity. This mean intensity is given by the formula

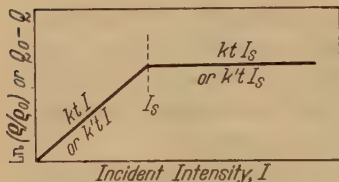


Fig. 3. Idealized curve of growth rate or photosynthetic rate vs. light intensity when attenuation by the bacterial suspension is negligible.

$$\langle I \rangle = \frac{\int_v I_v dv}{\int_v dv}, \quad (4)$$

where ρ is the amount of photosynthesizing material per unit volume, I_v is the intensity in the element of volume dv , and the integration is carried out throughout the vessel. Equations (2a) and (3a) then become

$$\text{Ln } (\rho/\rho_0) = kt \langle I \rangle \quad (\text{incident } I \leq I_s) \quad (5a)$$

$$\text{and } Q_0 - Q = k't \langle I \rangle \quad (\text{incident } I \leq I_s), \quad (6a)$$

where the left hand members are the observed mean values. If the intensity of light incident on the culture is so great that the intensity is above saturation throughout the culture, the rate everywhere is the same and equations (2b) and (3b) remain

$$\text{Ln } (\rho/\rho_0) \text{ (observed mean value)} = ktI_s \text{ (least intensity } \geq I_s) \quad (5b)$$

$$\text{and } Q_0 - Q \text{ (observed mean value)} = k'tI_s \text{ (least intensity } \geq I_s). \quad (6b)$$

In the region of transition, where a saturating incident intensity is attenuated to values below saturation within the culture, the dependence of observed photosynthetic rate on mean intensity is neither linear nor constant. In terms of observed mean rates and mean intensity, Fig. 3 now assumes the appearance of Fig. 4. Extensions of the two straight portions of the curve intersect at a mean intensity equal to I_s . We have assumed that the mean intensity $\langle I \rangle$ does not change with time during the course of an experiment. This is not true; the mean intensity decreases slightly as the culture becomes more dense. The influence of this effect was found, however, to be insignificant in our experiments.

Our next task is to calculate the mean intensity $\langle I \rangle$ in the bacterial suspension. In all experiments the cells were distributed uniformly throughout the vessel. The geometry of the system is shown in Fig. 5. Incident light, after penetrating a layer of suspension, is returned through the suspension *via* a mirror. The coordinate x measures the distance from the bottom of the vessel to a point within the vessel. In view of the uniform distribution of cells and the symmetry of the system, equation (4) reduces to

$$\langle I \rangle = \int_0^1 I_x dx, \quad (7)$$

where I_x is the intensity at a depth x . I_x is the sum of two components, the incoming light and the light returned *via* the mirror.

The attenuation of monochromatic light by a non-scattering solution is given ideally by

$$I_d/I = e^{-\alpha c d}, \quad (8)$$

where I is the incident intensity, I_d is the intensity at a depth of penetration d , c is the concentration of light-absorbing solute, and α is the extinction coefficient. In our case we are dealing with white light and with a strongly scattering suspension. Nevertheless we shall use, as a first approximation, the form of equation (8), with an effective extinction coefficient which was determined experimentally. The validity of this approximation is supported by the fact that a fourfold dilution of a suspension

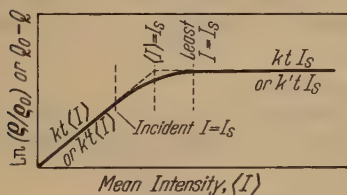


Fig. 4.

Fig. 4. Idealized curve of mean growth rate or photosynthetic rate vs. mean light intensity when attenuation by the bacterial suspension is appreciable.

Fig. 5. Path of light through the culture vessel used for photosynthesis measurements.

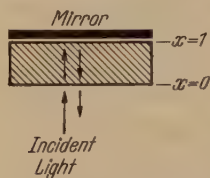


Fig. 5.

of *Rh. rubrum* leads to a fourfold reduction in the density as measured on the KLETT-SUMMERSON Colorimeter; the calibration of this instrument involves equation (8). The „incoming“ part of I_x , then, is given by $Ie^{-\alpha \varrho x}$, where ϱ is the density of bacteria and α is the effective extinction coefficient. The „returning“ part of I_x consists of light which has penetrated a distance of $1 + (1 - x)$, so that it is given by $Ie^{-\alpha \varrho (2-x)}$. Equation (7) now becomes

$$\langle I \rangle = \int_0^1 I [e^{-\alpha \varrho x} + e^{-\alpha \varrho (2-x)}] dx,$$

or

$$\langle I \rangle = I \left[\frac{1 - e^{-2\alpha \varrho}}{\alpha \varrho} \right]; \quad (9)$$

$\langle I \rangle$ is the mean intensity, I is the incident intensity, ϱ is the bacterial density, and α is a constant to be determined experimentally (the determination of this constant will be discussed presently). Plots of the observed increase of density or rate of substrate disappearance against $\langle I \rangle$ yield the saturating intensity, as shown in Fig. 4.

In practice the quantity taken for q_0 was not the initial density but the final density of a preparation kept in the dark; this choice compensated for changes in density not due to photosynthetic activity.

B. Calibration of incident intensities.

A comparison of the intensities employed in phototaxis and photosynthesis measurements is complicated by the use of white light. Unequal attenuation, at different wave lengths, by the bacterial suspension was compensated by the use of an experimentally determined effective extinction coefficient. However, the incident light in the photosynthesis measurements did not have the same spectral composition as the light used in the phototaxis measurements, since two different types of lamp were employed. To compare the effective intensities in the two cases it was necessary, then, to use *Rh. rubrum* as a photometric device. Accordingly the intensities were calibrated in the following manner: The intensity of the illuminated field used in phototaxis measurements was determined, with all combinations of attenuators, by means of a photographic exposure meter. The various intensities in the phototaxis field (bright strip) were found to be 3.2, 11.5, 23, 38, 60, 100, 160, 200, 275, and 425 foot candles. The intensities incident on the photosynthesis vessels were then measured with the same meter; the readings of the meter were 17, 30, 38, 60, 110, 180, 260, and 330 foot candles. A correction was then determined which would make these values comparable, as far as the bacteria were concerned, to the values in the phototaxis field. Vessels containing a suspension of the bacteria were placed in the dark, in the phototaxis field set at 60 foot candles, and in three of the photosynthesis baths set at 38, 60, and 110 foot candles. The results of six hours' growth are shown in Table 1.

Table 1. *Explanation in text.*

Vessel	$\text{Ln } (q/q_0)$, 6 hrs	$\text{Ln } (q/q_0) \div I$	Adjusted I
phototaxis field, 60 ft. c.	0.136	0.00227	
photosynthesis bath, 38 ft. c.	0.055	0.00145	25
photosynthesis bath, 60 ft. c.	0.089	0.00148	39
photosynthesis bath, 110 ft. c.	0.164	0.00149	71

The quotient $\text{Ln } (q/q_0) \div I$ was averaged for the three samples in photosynthesis baths, yielding the figure 0.00147. The incident intensities in the photosynthesis baths were then adjusted by the factor 0.00147/0.00227, making them consistent with the intensity of the phototaxis field on the basis of these growth measurements. Adjusted intensities in the photosynthesis baths were 11, 19, 25, 39, 71, 116, 168, and 214 foot candles.

C. Determination of the effective extinction coefficient.

The extinction coefficient in equation (9) was determined by comparing the curves of growth *vs.* intensity for suspensions having two different densities of bacteria. Cells were grown, centrifuged, and resuspended in yeast autolysate-pyruvate medium in two batches having different densities. Both suspensions, made from the same crop of cells, showed the same phototactic saturating intensity (200 ft. c.) and were assumed to have the same photosynthetic saturating intensity. Their growth at different intensities in the photosynthesis baths is shown in Fig. 6 (note that the abscissa represents incident intensity; $\langle I \rangle$ is not yet known). The incident intensity for which $\langle I \rangle$ corresponds to saturation ($\langle I \rangle = I_s$) was found to be 43.5 ft. c. in one case and 73 ft. c. in the other. Taking equation (9) into account,

with $q = 108$ and 493 respectively, we have

$$I_s = (43.5) \frac{1 - e^{-2\alpha \cdot 108}}{\alpha \cdot 108}$$

and

$$I_s = (73) \frac{1 - e^{-2\alpha \cdot 493}}{\alpha \cdot 493}$$

for the two cases. Solving these equations for α by eliminating I_s , we obtain $\alpha = 0.0016$. For this experiment equation (9) then yields $\langle I \rangle = 1.00 I$ (dense suspension) and $\langle I \rangle = 1.68 I$ (dilute suspension); $I_s = 73$ ft. c. (both suspensions). The curves of Fig. 6, in terms of $\langle I \rangle$ instead of I , are shown in Fig. 7; all subsequent data will be presented in this way.

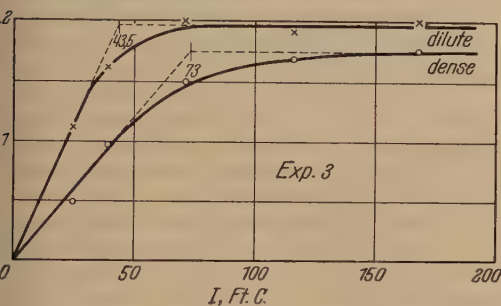


Fig. 6.

Fig. 6. Curves of growth rate vs. incident light intensity for dilute and dense suspensions of *Rhodospirillum rubrum*.

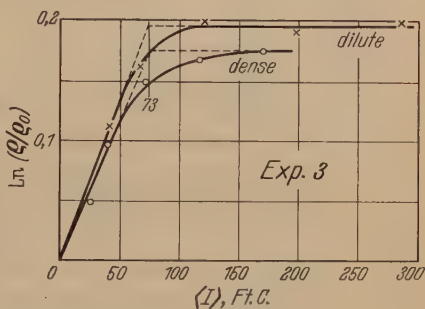


Fig. 7.

Fig. 7. Curves of growth rate vs. mean light intensity for dilute and dense suspensions of *Rhodospirillum rubrum*.

D. Calibration of p_H measurements.

The change in p_H resulting from a given amount of substrate decomposition was determined as follows: The third medium described in Part A contains, initially, 0.005 M sodium acetate (or 0.004 M sodium propionate) and 0.03% (0.00357 M) sodium bicarbonate, in addition to other constituents. If all of the acetate is assimilated by the bacteria in the form of acetic acid, the 0.005 mols of sodium acetate in a liter of suspension will be converted to 0.005 mols of NaOH. In addition, it was found by VAN NIEL (1944) that the assimilation of one mol of acetic acid by *Rh. rubrum* is accompanied by the liberation of about 0.2 mols of CO_2 . The changes in the composition of the medium resulting from complete utilization of acetate will then be:

1. Conversion of 0.005 M NaAcetate to 0.005 M NaOH.
2. Appearance of 0.001 M CO_2 .

Combining these effects, we have $0.005 \text{ M NaAcetate} \rightarrow 0.004 \text{ M NaOH} + 0.001 \text{ M NaHCO}_3$, so that the medium contains initially $0.005 \text{ M NaAcetate} + 0.00357 \text{ M NaHCO}_3$ and finally $0.004 \text{ M NaOH} + 0.00457 \text{ M NaHCO}_3$. When half decomposed the medium contains, aside from the constituents excluded in this discussion, $0.0025 \text{ M NaAcetate} + 0.002 \text{ M NaOH} + 0.00407 \text{ M NaHCO}_3$. In this way the essential constitution of the medium in any stage of decomposition can be predicted. When the substrate contains propionate our considerations are changed only by the fact that the utilization of one mol of propionic acid is attended by the assimilation of about 0.3 mols of CO_2 (VAN NIEL, 1944), rather than the liberation of 0.2 mols of CO_2 .

To correlate alkalinity with substrate decomposition, solutions were made up on the basis of the foregoing calculations and their p_H was measured. The results of these measurements are shown in Fig. 8, in which the position of the zero on the abscissa is arbitrary. It should be remembered that the reference to „substrate decomposed“ in Fig. 8 is based on assumptions as to the exact constitution of the medium in which the bacteria are suspended. The medium used in this calibration and in experiments

involving p_H measurement is the third one listed in Section I, Part A.

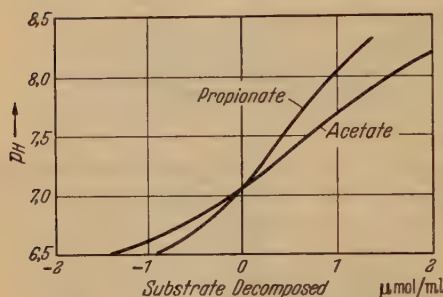


Fig. 8. Curves of p_H vs. substrate decomposition by *Rhodospirillum rubrum* in weakly buffered acetate and propionate media.

acetate was followed by the two methods. Results are shown in Fig. 9 (here, as in Fig. 8, the reference to „acetate decomposed“ implies an assumption relating disappearance of acetate and CO_2). Conditions in the two types of vessels differed in two ways. First, the p_H remained roughly constant in the WARBURG vessel because of the continuous uptake of CO_2 ; in the tissue culture vessels the p_H rose from about 6.8 to 8.0. This accounts for the steady decline of photosynthetic rate in the tissue culture vessels. Second, bubbling of the suspension, at p_H 6.8, with $N_2 + 5\%$ CO_2 removed most of the bicarbonate from the portion which was placed in the WARBURG vessels, since 5% of one atmosphere is less than the equilibrium pressure of CO_2 above an aqueous solution at this p_H . As a result, the photosynthetic rate in these vessels was very low until bicarbonate had been replaced from the gas phase. This is in accord with VAN NIEL's (1941) observations on the rate of photosynthesis of *Rh. rubrum* in the presence of acetate and varying concentrations of bicarbonate. When these two effects are taken into account, the agreement between the estimation of photosynthesis by p_H determinations and by WARBURG manometry is excellent.

III. Observations.

Detailed data for an experiment in which photosynthesis was measured by p_H determinations are presented in Table 2. Cells were grown for 24 hours from a 10% inoculum in yeast autolysate-pyruvate medium,

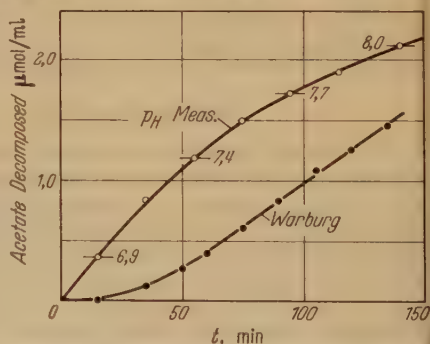


Fig. 9. Course of acetate decomposition by *Rhodospirillum rubrum*, determined by measurement of p_H and by manometric measurement of CO_2 uptake.

resuspended and maintained for 24 hours in well buffered 0.005 M acetate medium, and then divided into two portions. One portion was resuspended in weakly buffered 0.005 M acetate medium; the other in weakly

Table 2. *Data yielding saturating light intensities for photosynthesis and phototaxis of Rhodospirillum rubrum.*

<i>I</i>	$\langle I \rangle$	p _H , 30 min	p _H , 90 min	Δ acetate, $\mu\text{mol/ml hr}$	Δ acetate, (net) $\mu\text{mol/ml hr}$
Acetate:					
0	0	7.01	6.97	—0.09	0
25	33	7.00	7.02	0.05	0.14
39	52	7.00	7.07	0.14	0.23
71	95	7.00	7.08	0.16	0.25
116	155	7.01	7.08	0.14	0.23
168	225	7.02	7.10	0.15	0.24
Acetate plus propionate:					
0	0	6.98	6.94	—0.08	0
25	33	6.99	7.02	0.07	0.15
39	52	7.00	7.07	0.14	0.22
71	95	7.00	7.09	0.18	0.26
116	155	7.01	7.11	0.19	0.27
168	225	7.02	7.11	0.17	0.25

Acetate:			Acetate plus propionate:		
time	<i>I</i>	phototactic accumulation	time	<i>I</i>	phototactic accumulation
1319	21	5	1341	21	10
1322	38	3	1345	38	10
1326	60	0	1350	60	0
1334	160	0	1359	160	0
1550	21	10	1546	21	10
1558	38	10	1554	38	5
1606	60	1/2	1602	60	0
1610	100	0			

buffered 0.005 M acetate *plus* 0.004 M propionate medium. Both suspensions were brought to a density of 270 as measured on the KLETT-SUMMERSON Colorimeter (green filter), and placed in tissue culture vessels. Phototaxis preparations were set up at the same time. After 30 min in daylight the contents of each vessel were examined with a BECKMAN p_H Meter; the p_H of each sample was found to be about 0.06 units greater than that of a control kept in the dark. After one hour in the photosynthesis baths, the p_H of each sample was measured again. Once more the vessels were exposed to 30 min daylight; as a result the p_H of

each sample again rose about 0.06 units. The substrate decomposition corresponding to the p_H change during one hour in the photosynthesis bath was determined for each sample. A net value was obtained by subtracting the change shown by a sample kept in the dark; this procedure compensated for non-photosynthetic p_H changes. In this experiment the

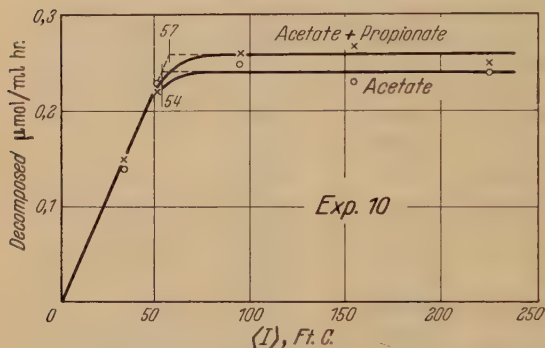


Fig. 10. Photosynthetic saturation curves, rate of substrate decomposition vs. light intensity, for *Rhodospirillum rubrum* (Experiment 10).

photosynthetic rate with acetate plus propionate was the same, within the accuracy of measurement, as the rate with acetate alone. It was concluded that the utilization of propionate was negligible.

Table 2 also shows the phototaxis data; the light intensity saturating for phototaxis was determined, by interpolation between successive measurements, to be 55 ft. c. with acetate and

50 ft. c. with acetate plus propionate. Saturation curves, drawn from the data of Table 2, are shown in Fig. 10. The saturating intensities for photosynthesis are seen to be 54 ft. c. (acetate) and 57 ft. c. (acetate plus propionate).

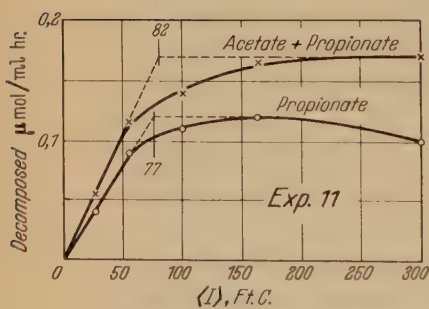


Fig. 11.

Fig. 11. Photosynthetic saturation curves for *Rhodospirillum rubrum* (Experiment 11).

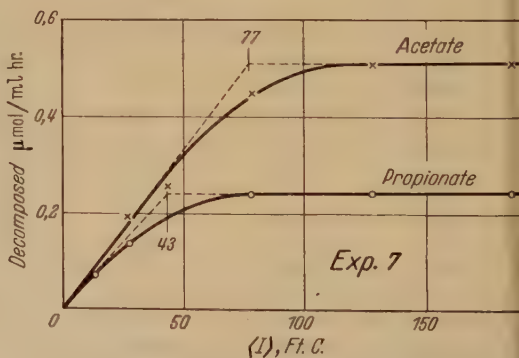


Fig. 12.

Fig. 12. Photosynthetic saturation curves for *Rhodospirillum rubrum* (Experiment 7).

Saturation curves for other experiments are shown in Fig. 11–13. Fig. 11 represents an experiment employing p_H measurement with propionate and with acetate plus propionate. Fig. 12 represents a similar experiment with acetate and with propionate. Fig. 13 represents an experiment in

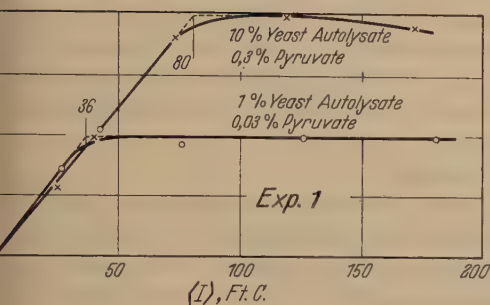


Fig. 13. Photosynthetic saturation curves, rate of growth vs. light intensity, for *Rhodospirillum rubrum* (Experiment 1).

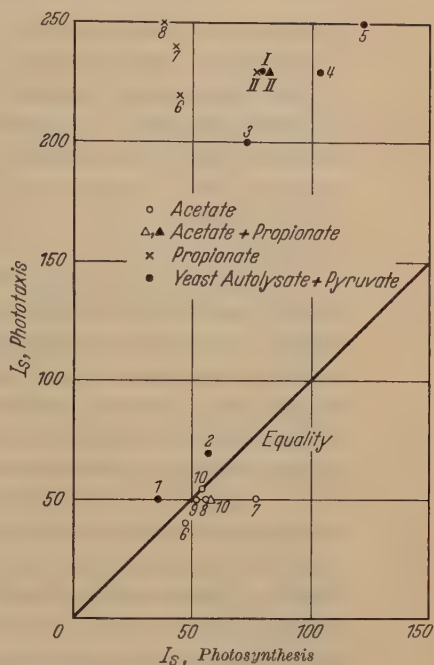


Fig. 14. Comparison of saturating intensities for phototaxis and for photosynthesis.

Table 3. Saturating light intensities for photosynthesis and phototaxis of *Rhodospirillum rubrum* under various conditions.

Expt. No.	Method	Substrate	I_s , phototaxis	I_s , photosynth.	I_s (taxi) I_s (synth.)
1a	growth	10% yeast autolysate, 0.3% sodium pyruvate	230	80	2.9
1b	growth	1% yeast autolysate, 0.03% sodium pyruvate	50	36	1.4
2	growth	3.3% yeast autolysate, 0.1% sodium pyruvate	70	57	1.2
3	growth	same as Expt. 1a. . . .	200	73	2.7
4	growth	same as Expt. 1a. . . .	230	104	2.3
5	growth	same as Expt. 1a. . . .	250	122	2.0
6a	growth	0.0167 M Na acetate . .	40	47	0.85
6b	growth	0.0135 M Na propionate .	220	45	4.9
7a	pH	0.005 M Na acetate . . .	50	77	0.65
7b	pH	0.004 M Na propionate .	240	43	5.8
8a	pH	0.005 M Na acetate . . .	50	56	0.89
8b	pH	0.004 M Na propionate .	250	38	6.6
9	pH	0.005 M Na acetate . . .	50	52	0.96
10a	pH	0.005 M Na acetate . . .	55	54	1.0
10b	pH	0.005 M Na acetate, 0.004 M Na propionate .	50	57	0.88
11a	pH	0.004 M Na propionate .	230	77	3.0
11b	pH	0.005 M Na acetate, 0.004 M Na propionate .	230	82	2.8

which growth was measured, using yeast autolysate-pyruvate medium and a tenfold dilution thereof.

The results of all experiments are summarized in Fig. 14, in which the saturating intensity for phototaxis is plotted against that for photosynthesis. Table 3 summarizes the nature of each experiment; the number in the first column of Table 3 appears next to the appropriate point in Fig. 14.

Discussion.

We see from Fig. 14 that the ratio of saturating intensity for phototaxis to that for photosynthesis depends markedly upon what substance serves as hydrogen donor for the photosynthetic process. In the presence of acetate the ratio is in the neighborhood of unity, while with propionate the ratio is about four. If both acetate and propionate are present the ratio is again about four, provided that both substrates are being utilized. If one of the two substrates is not being oxidized it has no apparent effect upon the saturating intensity for phototaxis; the ratio of saturating intensities then corresponds to that in the presence of the other substrate alone.

At this point one might ask whether the rate of decomposition of substrate is a proper index of the rate of photosynthesis, when the effects of different substrates are compared. It may be that the oxidation of one mole of propionate leads to a greater transfer of hydrogen than does the oxidation of one mole of acetate, and thus enables more CO_2 (or its equivalent) to be reduced photosynthetically¹. The rate of photosynthesis in the presence of propionate might then be much greater than that in the presence of acetate, when each substrate is utilized at the same rate. That this is not the case is indicated by the fact that acetate and propionate are utilized at roughly the same rate when the light intensity is low; *i. e.*, when the rate of photosynthesis is limited by the number of light quanta absorbed per second. Moreover we are concerned not with the rate but with the saturating intensity for photosynthesis; this will equal the saturating intensity for substrate utilization in any case.

We find, then, that the saturating intensity for phototaxis is influenced markedly by the nature of the substrate which serves for photosynthesis; this is in accord with MANTEN's hypothesis that photosynthesis and phototaxis are closely related. However, we find that the saturating intensity for phototaxis is either roughly equal to or much greater than that for photosynthesis; this is in agreement with the idea, dictated by the necessity of accounting for accommodation, that the phototactic response depends not upon a change in the "steady-state" rate of photosynthesis but upon a transient disturbance in the chain of reactions which comprise photosynthesis.

¹ For a detailed treatment of the mechanism of photosynthesis in purple bacteria see C. B. VAN NIEL, *American Scientist* **87**, 371 (1949).

The striking effect of propionate upon the saturating intensity for phototaxis suggests that the transient change which is important in the mediation of phototaxis is localized in the region of substrate oxidation. This idea is strengthened, and MANTEN's hypothesis is supported convincingly, by a consideration of the aerotaxis exhibited by *Rh. rubrum* (unpublished observations by the author)¹.

If an air bubble is introduced into an illuminated culture of *Rh. rubrum*, the bacteria withdraw from the region around the bubble; the pattern of this withdrawal is established as rapidly and as decisively as is the phototactic pattern of withdrawal from a dark region. This effect can be explained if we suppose that oxygen competes, for the hydrogen transferred from the substrate, with an oxidizing substance involved in photosynthesis. In that case oxygen inhibits the rate of photosynthesis, and either a rise in oxygen concentration or a sudden decrease in illumination might produce the type of transient disturbance necessary for a tactic response.

If *Rh. rubrum* is maintained in the dark, under aerobic conditions, it pursues an oxidative metabolism in which the exergonic oxidation of the substrate, by oxygen, provides energy for the reduction of CO₂ (or its equivalent) to cell materials. The same substrates which serve in photosynthesis are suitable for the oxidative metabolism; the essential difference between the two processes is that in the former the required energy is absorbed as light, and oxygen is either inactive or inhibitory, while in the latter oxygen serves as a source of energy, and its presence is essential to the synthetic process. If one introduces an air bubble into an illuminated culture of *Rh. rubrum*, causing the bacteria to withdraw from the bubble, and then places the preparation in the dark, the pattern is soon reversed: bacteria congregate about the bubble, in the same way that they congregate phototactically in a spot of light. Under these conditions the tactic response is associated with a decrease in oxygen concentration, which corresponds to a decrease in the rate of oxidative metabolism, just as the phototactic response is associated with a decrease in illumination which corresponds to a decrease in the rate of photosynthesis.

The foregoing considerations again direct our attention toward the oxidation of the substrate when we speculate as to the location of the interaction between metabolism and taxis; furthermore they support the hypothesis of MANTEN that the mediation of phototaxis is, indeed, related to the pathways of photosynthesis. It is hoped that a thorough study of the influences of light and oxygen upon photosynthesis and upon oxidative metabolism, coupled with observations of tactic behavior, will provide more information on this subject.

¹ Earlier interpretations of aerotaxis mentioned by the author (Thesis, Pasadena, 1951) were vitiated by a failure to account for or to suppress fermentative metabolism.

Summary.

1. Simultaneous determinations were made of the saturating intensities for phototaxis and for photosynthesis of *Rhodospirillum rubrum*. The values of these intensities were found to be unequal in general, and their ratio was found to vary widely under different environmental conditions.

2. Some observations on the aerotaxis of *Rh. rubrum* are described.

3. The foregoing observations are discussed in connection with MANTEN's hypothesis relating phototaxis to a decrease in the rate of photosynthesis; the validity of this hypothesis is supported.

Acknowledgments.

The author wishes to thank Prof. C. B. VAN NIEL for his valuable suggestions and supervision.

This work was supported by a MERCK Postdoctoral Fellowship; thanks are accordingly extended to the MERCK Foundation.

References.

MANTEN, A.: *Ant. van Leeuw.* **14**, 65 (1948). — VAN NIEL C. B.: *Adv. in Enzymology* **1**, 263 (1941). — *Bact. Rev.* **8**, 1 (1944). — THOMAS, J. B.: *Biochim. et Biophys. Acta* **5**, 186 (1950). — THOMAS, J. B., and L. E. NIJENHUIS: *Biochim. et Biophys. Acta* **6**, 317 (1950).

(Hopkins Marine Station, Pacific Grove, Calif.)

Studies in the phototaxis of *Rhodospirillum rubrum*.

III. Quantitative relations between stimulus and response.

By

RODERICK K. CLAYTON*.

With 23 figures in the text.

(Eingegangen am 25. März 1953.)

The present article describes quantitative investigations of the phototactic response of *Rhodospirillum rubrum*, undertaken to provide more information on the nature of biological irritability. In particular, we wish to determine whether a knowledge of details in the chemical mediation of phototaxis is likely to be of value in elucidating the chemical reactions involved in other cases of irritability (for example, the visual processes of animals). Let us begin by reviewing briefly a few properties which seem to be characteristic of living irritable systems.

1. The "all-or-none" nature of the response: The magnitude of the response, when it occurs, is independent of the strength of the stimulus. The latter acts as a trigger, its energy serving only to initiate a sequence of activities in the organism culminating in a response. The energy released in the response is derived from metabolic activity of the organism.

2. The refractory period: After a response, the organism is unable to respond to another stimulus for a certain period; this interval is necessary for recovery.

3. Accommodation: A stimulus which reaches its full strength quickly is more effective than a slowly increasing stimulus in eliciting a response. Evidence to date indicates that a stimulus initiates not only an excitatory process but also a secondary process which opposes excitation. A response will occur only if the excitatory process is well advanced before the inhibitory effect becomes appreciable; an abrupt stimulus favors this condition.

Having considered some general aspects of irritability, let us turn to the well known and exhaustively studied example of the nerve fiber. This outgrowth of a single cell can be stimulated by passing an electric current through its external membrane; a response is elicited either by

* Present address: U.S. Naval Postgraduate School, Monterey, Calif.

the onset of an outward-flowing (cathodal) current or by the cessation of an inward-flowing (anodal) current. The response is indicated by a wave of electrical negativity which progresses across the surface of the fiber, away from the point of stimulation. The magnitude and speed of propagation of this disturbance are independent of the strength of the stimulus; thus it displays the characteristic "all-or-none" property. Immediately after a response, an absolutely refractory period can be observed during which the strongest stimuli fail to excite the fiber; this is followed by a period during which the threshold for excitation (the least stimulus which will lead to a response) declines to a minimal value which indicates complete recovery of the fiber. Accommodation is seen in the low effectiveness of a stimulating current which is built up gradually, when compared with that of an abrupt stimulus. It is also manifested by the refractory condition which can be detected in a nerve fiber after a subliminal stimulus.

Progress in nerve research began with the detection and measurement of the foregoing effects through determinations of the threshold values of pulses and pairs of pulses of stimulating current; the variable parameters were strength, duration, and "shape" of the pulse. Schemes, involving the formation and dissipation of hypothetical excitatory and inhibitory substances, were then devised to account for these data. In 1932, BLAIR presented a "one-factor" theory, in which an excitatory process alone was postulated; accommodation was supposed to result from dissipation of the excitatory effect. It became apparent that an additional process, inhibitory in nature, would have to be invoked to account satisfactorily for some aspects of accommodation; HILL and RASHEVSKY were thus led to propose similar "two-factor" theories. The theories of HILL and of RASHEVSKY have been as successful as any in accounting for the numerical data relating stimulus and response. Finally, a thorough electrochemical study of the nerve fiber has been pursued with the aim of gaining more specific information on the processes involved in excitation.

It is hoped that the study of systems other than nerve fibers will help to elucidate the nature of irritability, both by checking the generality of the results of nerve research and by revealing the limitations which must be imposed upon a theory of sufficient generality to embrace a wide variety of irritable structures. The purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* is well suited to this purpose. Its phototactic response, a reversal of swimming direction, is easily observed and is unmistakably of an all-or-none character. The stimulus, a decrease in the intensity of light reaching the bacterium, is easily controlled and defined in terms of energy. The effects of refractoriness and accommodation can be demonstrated readily by simple microscopic observations.

I. Theoretical considerations.

A. *The Nature of the System.*

We shall assume that *Rhodospirillum rubrum* contains an irritable mechanism giving rise to the characteristic effects discussed in the last section, upon which are superimposed various accessory mechanisms adapting the system to the function of light perception. To be studied effectively, the basic irritable mechanism must be isolated, freed of any obscuring influences of the accessory processes. Thus we are led to the necessity of a detailed study of the constitution and activities of the organism. In addition to delineating the (assumed) irritable mechanism by identifying its accessories, such a study might provide valuable information on the manner in which these components of the system are related.

The foregoing paragraph will be clarified by a consideration of vision in higher animals. The following sequence of events is known to occur in this case: 1. Absorption of light by a pigmented réceptor cell. — 2. Chemical changes in the visual pigment system. — 3. Electrical effects in the neighborhood of the receptor cell. — 4. Excitation of an optic nerve fiber. — 5. Excitation of an effector system via a sequence of connecting nerve cells.

Here the pigment system appears to be an accessory device which changes light into a suitable (probably electrical) stimulus for a nerve fiber, in which an irritable mechanism resides. Excitation of one nerve fiber then leads to stimulation of the next; in this way an effector cell can ultimately be stimulated (the complication of convergent, divergent, and cross-connecting nervous pathways is omitted here). As far as irritability is concerned, one nerve fiber is as suitable for study as another, since each displays the fundamental properties of an irritable cell. The point we wish to make clear is that the processes peculiar to light reception and to effector organs, while interesting in themselves, should not be confused with the basic irritable mechanism.

When the eye of any of a variety of animals is exposed to a pulse of light, fibers of its optic nerve can be found which respond either to the onset or to the termination of the pulse, or to both; these types of response are denoted "on", "off", and "on-off"; respectively. These different responses might result from differences in electrical polarity arising at the junctures of successive cells, so that the fiber under observation might receive either a cathodal ("on" fiber) or an anodal ("off" fiber) stimulus. We mention this because of the striking similarity between the phototaxis of *Rh. rubrum* and the "off" response in visual systems of higher animals.

We assume, then, that through the pigment system of *Rh. rubrum* a decrease of light intensity leads to a suitable (perhaps electrical) stimulus

for an irritable system, and that the excitation of this system leads to a phototactic response. The separation of the photoreceptive system from the primary irritable mechanism is evidenced by the existence of a chemotactic response, similar to the phototactic one, which is elicited by a change in concentration of any of a wide variety of chemicals, notably oxygen.

If we are to compare data for phototaxis with data for nerve excitation we must make some assumption relating the initial stimulus, light, to the immediate stimulus of the basic irritable system in *Rh. rubrum*. In the absence of definite information we shall assume a proportionality between light quanta and ions, electrons, or whatever particles constitute the stimulus of the irritable system. Such a correspondence can be expected to break down at high light intensities, due to saturation of the pigment system. If we employ light intensities which are below the saturating value for phototaxis, then, we shall regard intensity of illumination as proportional to the stimulus of the irritable system. We shall also assume that each excitation of this system leads to an observable phototactic response.

B. RASHEVSKY's *Theory of Excitation.*

In analyzing the results of our investigations, and in comparing the outcome of our analysis with the kinetics of nerve excitation, it will be convenient to refer to some hypothetical mechanism. The predictions of such a working hypothesis will serve both as a yardstick for the comparison of data and as a guide for the selection of useful experiments. In choosing this hypothesis we must keep two facts in mind:

1. The phototactic response of *Rh. rubrum* exhibits a close adherence to the WEBER Law when the saturating light intensity for phototaxis is not unusually low. The liminal decrease in light intensity is a constant fraction of the initial intensity for values of the latter covering usually, a range of a hundredfold or more (CLAYTON, 1953a). While the source of this effect may lie in the photoreceptive system, it would be desirable, although not essential, to choose as our working hypothesis a mechanism for irritability which predicts adherence to the WEBER Law.

2. The phototactic response is elicited only by a decrease in illumination, as is the excitation of an "off" fiber in the optic nerve of a vertebrate; the role of light is analogous to that of an anodal current in nerve excitation.

We have mentioned that the theories of HILL and of RASHEVSKY are in comparatively good agreement with the data describing the kinetics of nerve excitation. These closely similar theories give exactly the same predictions, as was shown by OFFNER, of intensity-time relations for a threshold stimulus. The form developed by RASHEVSKY is better suited,

however, to a treatment of the anodal stimulation of nerve, so that we shall prefer it as a frame of reference for the description of phototactic excitation. As we shall see, RASHEVSKY's theory predicts adherence to the WEBER Law.

In the following account of RASHEVSKY's theory we adopt a change of notation; the symbols ε and j are redesignated s and i respectively. The quantity I denotes the intensity of illumination of *Rh. rubrum*, rather than the strength of an electric current applied to a nerve fiber.

The theory assumes the existence of two substances or effects, one excitatory and one inhibitory. Their concentrations or magnitudes are denoted by s and i respectively; in the resting condition of the cell s and i assume the constant values s_0 and i_0 . Under stimulation, s and i are formed at rates proportional to the intensity of the stimulus; they are dissipated at rates proportional to their excess over the resting values. The differential equations describing s and i are therefore

$$\begin{cases} ds/dt = KI - k(s - s_0) \\ di/dt = MI - m(i - i_0), \end{cases} \quad (1)$$

where K , k , M , and m are constants. The criterion for excitation is $s \geq i$; as long as i exceeds s the system will not exhibit a response. The steady-state values for s and i under constant illumination I , obtained by equating ds/dt and di/dt to zero, are

$$s = s_0 + \frac{K}{k} I \quad \text{and} \quad i = i_0 + \frac{M}{m} I. \quad (2)$$

Since the system responds only when I changes, the steady-state value for s must be less than that for i at all values of I . From eqn. (2) we therefore require $s_0 < i_0$ and $K/k < M/m$. The general solution of (1), for the case of a constant value of I established at the time $t = 0$, is

$$\begin{cases} s - s_0 = \frac{K}{k} I (1 - e^{-kt}) + (s_1 - s_0) e^{-kt} \\ i - i_0 = \frac{M}{m} I (1 - e^{-mt}) + (i_1 - i_0) e^{-mt}, \end{cases} \quad (3)$$

where s_1 and i_1 are the initial values of s and i .

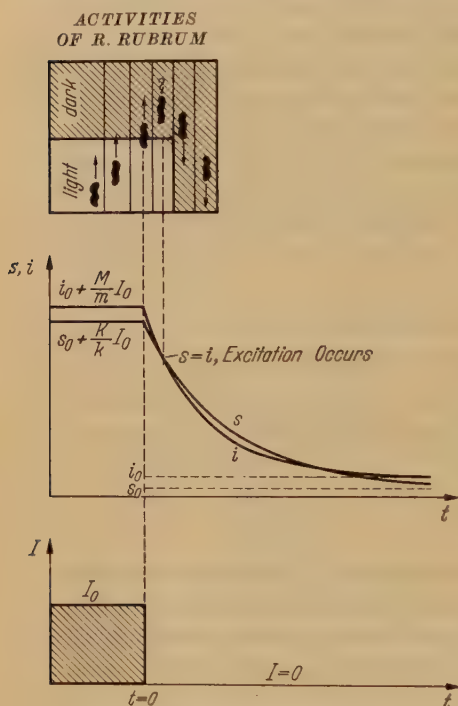
Let us consider the case in which the intensity of illumination is zero (corresponding to total darkness) for $t > 0$; then eqn. (3) has the form

$$\begin{cases} s - s_0 = (s_1 - s_0) e^{-kt} \\ i - i_0 = (i_1 - i_0) e^{-mt}. \end{cases}$$

If, prior to $t = 0$, the system had attained a steady state under a constant illumination I_0 , the initial values s_1 and i_1 are given by $s_1 = s_0 + \frac{K}{k} I_0$ and $i_1 = i_0 + \frac{M}{m} I_0$. Substitution of these values into the foregoing special case of eqn. (3) then yields

$$\begin{cases} s - s_0 = \frac{K}{k} I_0 e^{-kt} \\ i - i_0 = \frac{M}{m} I_0 e^{-mt} \end{cases} \quad (4)$$

Equations (4) and the corresponding physical situation are depicted in Fig. 1, for the case $m > k$. We see that in this case i begins to decrease more rapidly than s when I becomes zero; excitation occurs when the



two curves intersect ($i = s$). If $m < k$, i decreases more slowly than s after a reduction of I ; in this case the curves cannot intersect and excitation will not occur. Thus we require $m > k$ as well as $M/m > K/k$, which leads to the further requirement that $M > K$.

Detailed solutions of eqn. (3), yielding predictions of the conditions necessary for excitation, will be described in connection with each type of experiment performed. The patterns of stimulation (changes of illumination) used in these experiments include step-decreases, pulse-decreases, pulse-increases, and pairs of pulse-decreases.

Fig. 1. Explanation in text.

In applying the foregoing theory it was found helpful to redefine our constants and introduce dimensionless parameters for time and stimulating intensity. The following changes were made:

$$\gamma = m/k, \quad \varrho = M/K, \quad \tau = kt, \quad J = I \left(\frac{K/k}{i_0 - s_0} \right).$$

The criteria $m > k$ and $M/m > K/k$ become $\varrho > \gamma > 1$, and equations (2) and (3) become

$$\begin{cases} ds/d\tau = J(i_0 - s_0) - (s - s_0) \\ di/d\tau = \varrho J(i_0 - s_0) - \gamma(i - i_0) \end{cases} \quad (2a)$$

and

$$\begin{cases} s - s_0 = (s_1 - s_0) e^{-\tau} + J(i_0 - s_0)(1 - e^{-\tau}) \\ i - i_0 = (i_1 - i_0) e^{-\gamma\tau} + \frac{\varrho}{\gamma} J(i_0 - s_0)(1 - e^{-\gamma\tau}). \end{cases} \quad (3a)$$

II. Experimental procedure and treatment of data.

The essential experimental procedure consisted in observing microscopically a large number of individual phototactic responses of *Rh. rubrum* and determining the percentage of responses elicited by a given type of stimulus. Stimuli were applied by varying the illumination of the object field of the microscope.

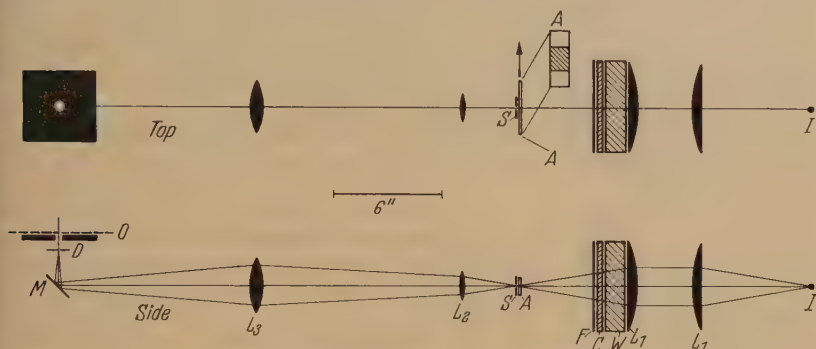


Fig. 2. Schematic diagram of optical system.

The instrumental arrangement is shown in Fig. 2; it consisted of a KÖHLER microscope illuminating system with a provision for controlled variations of intensity. The KÖHLER system began at a slit S , $\frac{1}{16}$ " wide, at which the filament of a 300 watt projection lamp I was imaged. The slit S was imaged, via lenses L_2 and L_3 and the substage mirror M , at the annular diaphragm D of the substage condenser of a phase-contrast microscope. The plane of the lens L_3 was imaged by the substage condenser at the object field O . The lens L_3 was an F/2.5 EASTMAN Aero-Ektar of 7" focal length; L_2 was an F/4 wide-angle Ross Express of 5" focal length. The source I was imaged at S by condensing lenses L_1 , via a water cell W , a copper sulfate cell C , a neutral filter F , and an attenuator A which moved across the optical path just behind the slit S . This attenuator contained adjacent regions of greater and lesser transparency; as it moved behind the slit at a definite speed the intensity of illumination of the object field O was altered in a controlled manner. The attenuator, mounted on a sliding carriage, was propelled smoothly by a stud which projected from a moving belt; the belt could be driven at a variety of speeds. Controls for engaging the stud with the sliding carriage and for returning the carriage to its starting position were within reach of an operator seated at the microscope.

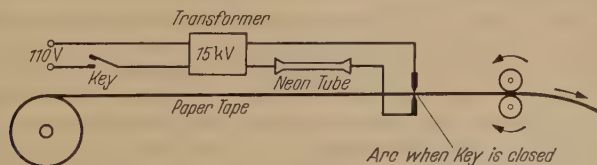


Fig. 3. Schematic diagram of recording apparatus.

Observations were recorded continuously on a moving paper tape by means of small holes burned electrically in the paper, as shown in Fig. 3. One series of holes, produced when movement of the attenuator carriage closed a switch, recorded the times at which changes of illumination began and ended. Another series, produced

manually by depressing a key, recorded the times at which phototactic responses were observed. In this way the interval between stimulation and response could be measured precisely (the reaction time of the operator being taken into account), and a continuous record of the observations was preserved.

A set of attenuators providing different temporal patterns and strengths of stimulation was made from semi-transparent mirrors (prepared by vacuum deposition of aluminum), uniformly exposed photographic plates, stacks of microscope cover glasses, and opaque strips of black paper. Successive regions of these attenuators were at least $\frac{1}{2}$ " in width; since the slit S was $\frac{1}{16}$ " wide the changes in light intensity were composed of steps and pulses which were effectively „square“. The illumination of the object field was also controlled by a suitable choice of the filter F (one of a set of uniformly exposed photographic plates).

Relative intensities were measured with a photographic exposure meter and expressed in arbitrary units.

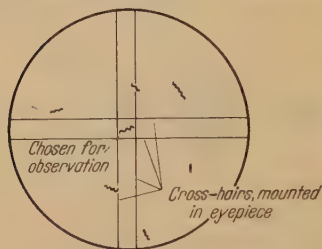


Fig. 4.

Fig. 4. Image field of microscope, showing method of random selection of bacteria.



Fig. 5.

Fig. 5. Punched tape record of a typical phototaxis observation.

Cultures of *Rh. rubrum* were grown in a medium containing sodium pyruvate and yeast autolysate, as described in an earlier publication (CLAYTON, 1953b). A suspension suitable for microscopic observation was prepared by placing one drop of the fully developed culture in 15 ml of fresh growth medium, filtered to remove debris. The resulting suspension was kept in daylight; fresh slides for observation were prepared from it every 15 min during the course of about three hours' experimentation.

The course of a typical experiment was the following: A certain attenuator was chosen, driven at a certain speed, giving a pulse of intensity decrease amounting to 41% of the initial intensity and lasting 0.25 sec. A filter, F , was chosen to make the initial and final intensities 32 arbitrary units; the intensity during the pulse-decrease was 41% less or 19 arbitrary units. A slide bearing the bacterial suspension was brought into focus on the microscope stage; superimposed on the image field was a small square at its center. This square, an image of double cross-hairs mounted in the eyepiece, facilitated random sampling of bacteria for observation (Fig. 4). When a bacterium entered the square, the start of an observation was recorded by three dots on the paper tape (Fig. 5). All responses (reversals of swimming direction) of this single bacterium were then recorded for a few seconds, after which a termination signal of three dots was recorded. In the mean time the stimulating pulse of intensity decrease was applied by engaging the drive mechanism of the attenuator. When the observation was terminated, the attenuator was returned to its starting position and the entire procedure was repeated with the next bacterium to enter the sampling square. After ten such observations the strength or duration of the stimulating pulse was altered and ten more observations were made. In the course of three hours' experimentation twenty sets of ten observations could be made.

In most cases the data were processed as follows: All ten of the records pertaining to one type (*e. g.*, strength and duration) of stimulus were superimposed, as shown in Fig. 6. The mean frequency of responses during the eight seconds before the stimulus was then computed and subtracted from the mean frequency during the four seconds after the onset of stimulation. In the case illustrated, the mean frequency before the stimulus (representing spontaneous activity) was $5 \div 10$ responses *per* eight second period, or 0,25 responses *per* four second period. The division by ten is performed because ten individual observations are combined here. The mean frequency during the four seconds after the start of stimulation was $7 \div 10$ responses *per* four second period; this represents the sum of spontaneous activity and phototactic responses. Subtracting the part attributed to spontaneous activity, we find the mean frequency of phototactic responses to be $0,70 - 0,25$ or $0,45$. A value of 1,00 would result if the rate of spontaneous activity were perfectly uniform and if a phototactic response occurred in every case. The threshold was defined as that stimulus which led to a phototactic response frequency of 0,40 (four responses out of ten trials); it was determined by interpolation between the frequencies observed with a graded series of stimuli, as shown in Fig. 7.

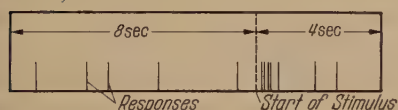


Fig. 6.

Fig. 6. Superposition of ten individual phototaxis observations.

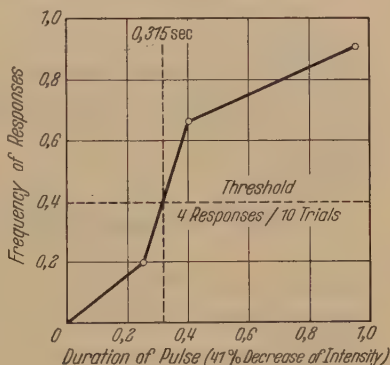


Fig. 7.

Fig. 7. Determination of threshold phototactic stimulus by interpolation.

In some experiments the latent period between the start of stimulation and the occurrence of a response was measured from the tape records; in a few cases the results are presented simply in the form shown in Fig. 6.

Each experimental point in the illustrations of data (Figures 11 to 17) was derived from about 300 single observations.

III. Results and comparison with hypothesis.

A. The "WEBER Law" Curve and the Strength-Duration Relation.

We shall derive first the necessary conditions for excitation by a step-decrease and by a pulse-decrease of intensity, as predicted by RASHEVSKY's theory. In the case of a step-decrease an initial intensity I_0 changes abruptly to a lesser value I at the time $t = 0$. From eqn. (2), the initial values of s and i are

$$\begin{cases} s_1 = s_0 + \frac{K}{k} I_0 \\ i_1 = i_0 + \frac{M}{m} I_0. \end{cases}$$

Substituting these into eqn. (3), we have

$$\begin{cases} s - s_0 = \frac{K}{k} I (1 - e^{-kt}) + \frac{K}{k} I_0 e^{-kt} \\ i - i_0 = \frac{M}{m} I (1 - e^{-mt}) + \frac{M}{m} I_0 e^{-mt} \end{cases} \quad (5)$$

Eqn. (5) can give rise to three distinct cases representing no excitation, threshold excitation, and above-threshold excitation, depending on the

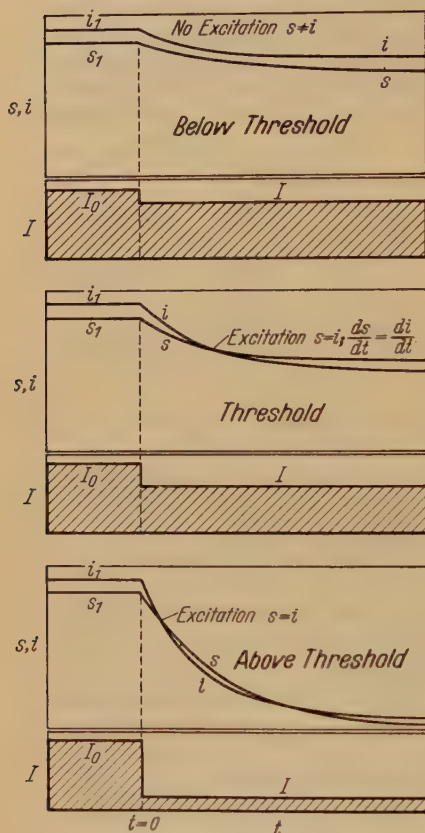


Fig. 8. Explanation in text.

values of I_0 and I ; these are illustrated in Fig. 8. The condition for excitation is found by requiring $s = i$ in eqn. (5). An equation is thus obtained relating I , I_0 , and t :

$$\frac{I_0 - I}{I_0} = \frac{k(i_0 - s_0)/KI_0 + \frac{Mk}{Km} - 1}{\frac{Mk}{Km}(1 - e^{-mt}) - (1 - e^{-kt})} \quad (6)$$

Here t represents the time at which excitation occurs. Since the stimulus need not be prolonged beyond the time of excitation, the duration of a threshold pulse of intensity decrease, from I_0 to I , is given by (6). As $(I_0 - I)/I_0$, hereafter denoted $\Delta I/I_0$, is made smaller, the required duration t becomes larger until it attains a critical value t^* , the "utilization time". At this value of t , $\Delta I/I_0$ has the least magnitude (the rheobasic value, denoted R) which can evoke a response. Prolongation of the stimulus beyond t^* is of no avail in eliciting a response, so that the rheobasic value, R , of $\Delta I/I_0$ represents the threshold step-decrease (pulse-decrease of infinite duration).

Equation (6) is illustrated in Fig. 9, for a given value of I_0 . The condition $t = t^*$ and $\Delta I/I_0 = R$ corresponds to the threshold case illustrated in Fig. 8, in which the curves of s and i vs. t become tangent but do not cross. Thus we can determine t^* by requiring $ds/dt = di/dt$ as well as $s = i$ in eqn. (5); the result is

$$t^* = \frac{\text{Ln}(M/K)}{m - k}, \quad (7)$$

independent of I_0 . From eqn. (6), the condition for excitation by a step-decrease is

$$\Delta I/I_0 = R = \frac{k(i_0 - s_0)/KI_0 + \frac{Mk}{Km} - 1}{\frac{Mk}{Km}(1 - e^{-mt^*}) - (1 - e^{-kt^*})}; \quad (8)$$

this relation between R and I_0 is illustrated in Fig. 10. Introducing the changes of parameters described in Sec. II, we have

$$\begin{cases} \Delta J/J_0 = (1/J_0 + \varrho/\gamma - 1)g(\tau), \\ 1/g(\tau) = \frac{\varrho}{\gamma}(1 - e^{-\gamma\tau}) - (1 - e^{-\tau}) \end{cases} \quad (6a)$$

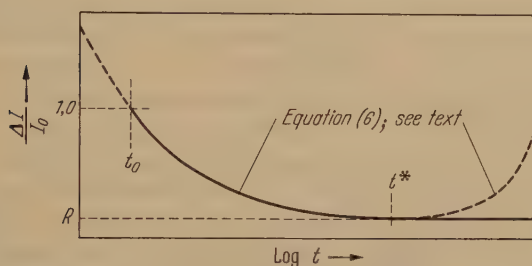


Fig. 9. Strength-duration curve for the phototaxis of *Rhodospirillum rubrum* under a pulse-decrease of light intensity, as predicted by RASHEVSKY's theory.

for a threshold pulse-decrease, and

$$\begin{cases} \Delta J/J_0 = R = (1/J_0 + \varrho/\gamma - 1)g(\tau^*), \\ 1/g(\tau^*) = \frac{\varrho}{\gamma}(1 - e^{-\gamma\tau^*}) - (1 - e^{-\tau^*}), \\ \tau^* = \frac{\text{Ln } \varrho}{\gamma - 1} \end{cases} \quad (8a)$$

for a threshold step-decrease of intensity. Note that the relation between R and J_0 given by equation (8a) is an hyperbola with asymptotes $J_0 = 0$ and $R = g(\tau^*)(\varrho/\gamma - 1)$.

Thus for large values of J_0 , R approaches the constant value $R_\infty = g(\tau^*)(\varrho/\gamma - 1)$, repre-

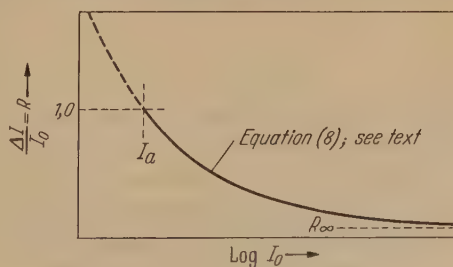


Fig. 10. "WEBER law" curve for the phototaxis of *Rhodospirillum rubrum* under a step-decrease of light intensity, as predicted by RASHEVSKY's theory.

senting adherence to the WEBER Law. Values of R greater than unity have no meaning, since the value $R = 1$ represents the onset of total darkness; $I = 0$ and $\Delta I = I_0$. Thus an "absolute threshold intensity"

I_a is defined, corresponding to $R = 1$ and representing the least intensity which can be distinguished from total darkness. Similarly a minimal duration, t_0 , is defined for a threshold pulse-decrease, corresponding to a pulse of total darkness (see Fig. 9). In terms of our dimensionless parameters its value τ_0 , obtained by equating $\Delta J/J_0$ to unity in eqn. (6a), is given by

$$e^{-\tau_0} - \frac{\varrho}{\gamma} e^{-\gamma \tau_0} = 1/J_0. \quad (9a)$$

A similar relation between τ^* and J_a , obtained from eqn. (8a), is

$$e^{-\tau^*} - \frac{\varrho}{\gamma} e^{-\gamma \tau^*} = 1/J_a. \quad (10a)$$

Having determined the forms of the strength-duration curve (Fig. 9) and the WEBER Law curve (Fig. 10) predicted by RASHEVSKY's theory, let us turn to the problem of fitting these curves to experimental data by evaluating the arbitrary constants. There appear to be six constants involved: K , k , M , m , i_0 , and s_0 . In our dimensionless notation, however, we find only four independent combinations of these constants: $\varrho = M/K$, $\gamma = m/k$, $\tau/t = k$, and $J/I = K/k(i_0 - s_0)$. To evaluate these four constants we require four equations relating them to experimentally determined quantities. By combining equations (8a), (9a), and (10a) in various ways, we obtain

$$\frac{\tau}{t} = \frac{\text{Ln } \varrho}{t^* (\gamma - 1)}; \quad (11a)$$

$$\frac{J}{I} = \frac{1}{I_a} \left(\frac{R_\infty}{1 - R_\infty} \right) \left(\frac{1}{\varrho/\gamma - 1} \right); \quad (12a)$$

$$R_\infty = \frac{\varrho/\gamma - 1}{\varrho/\gamma - 1 + (1 - 1/\gamma) \varrho^{\frac{1}{1-\gamma}}}; \quad (13a)$$

and

$$\frac{I_a}{I_0} = \frac{\left(\varrho^{\frac{1}{1-\gamma}} \right)^{t_0/t^*} - \frac{\varrho}{\gamma} \left(\varrho^{\frac{\gamma}{1-\gamma}} \right)^{t_0/t^*}}{\varrho^{\frac{1}{1-\gamma}} - \frac{\varrho}{\gamma} \left(\varrho^{\frac{\gamma}{1-\gamma}} \right)}. \quad (14a)$$

Thus we can evaluate the constants by a knowledge of R_∞ (the rheobasic value of $\Delta I/I_0$ at large values of I_0), of I_a (the absolute threshold intensity), of t^* (the utilization time), and of t_0 (the threshold duration of a pulse of total darkness) for a given value of I_0 . Since R_∞ and I_a are difficult quantities to measure, they are best determined indirectly as follows: Writing eqn. (8) in the form $R = a/I_0 + R_\infty$, and inserting $R = 1$ and $I_0 = I_a$ to obtain an expression for "a", we have

$$R = \frac{I_a}{I_0} (1 - R_\infty) + R_\infty. \quad (15)$$

By inserting two experimentally determined sets of R and I_0 into (15), we can calculate R_{∞} and I_a .

The experimentally determined values of the rheobase (liminal step-decrease) as a function of I_0 are presented in Fig. 11. The conditions

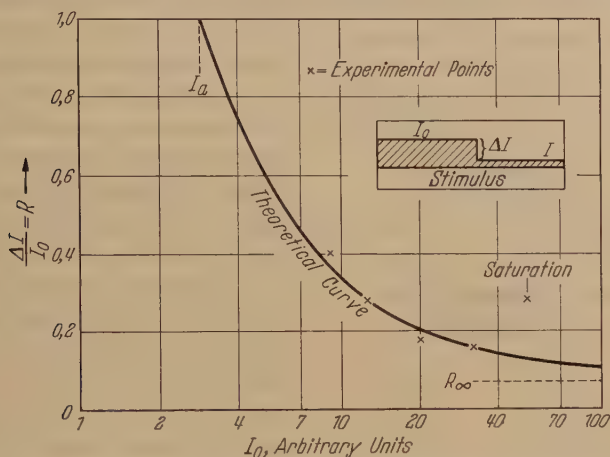


Fig. 11. Threshold step-decrease of light intensity for the phototaxis of *Rhodospirillum rubrum*, for different values of the initial intensity.

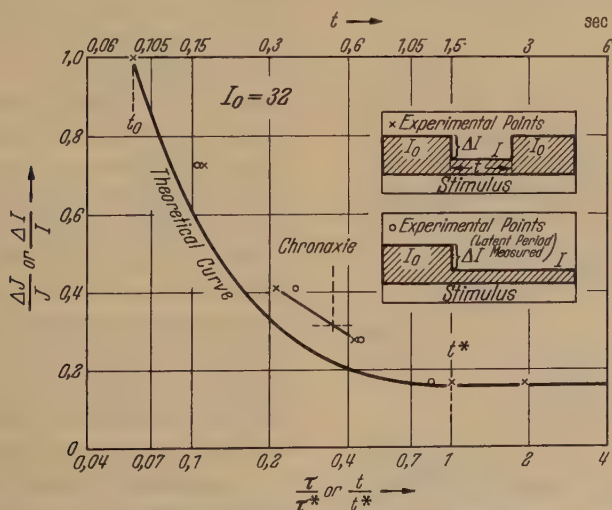


Fig. 12. Relation between threshold strength and duration of a pulse-decrease of light intensity, for the phototaxis of *Rhodospirillum rubrum*.

of this investigation were such that light saturation appeared at an unusually low intensity, as evidenced by the high value of R at $I_0 = 52$; the anticipated region of WEBER Law adherence was masked by this

early onset of saturation. Two of the experimental points were used to evaluate the constants of equation (15), which were found to be $R_\infty = 0.07$ and $I_a = 2.9$, and the entire theoretical curve of R vs. I_0 was drawn in the figure. While the agreement between these data and the theoretical curve is so crude as to be insignificant, the experiment did serve to determine some constants and therefore to make further tests of the theory more rigid.

We have already (Sec. I) limited the ratio ϱ/γ to values greater than unity; a further limitation is imposed by eqn. (13a), which can be satisfied only if ϱ/γ is less than $1/(1 - R_\infty)$, or 1.075 in the present case. A limitation is also imposed on the ratio t_0/t^* by eqn. (14a): If we choose $I_0 = 32$ and $1 < \varrho/\gamma < 1.075$, t_0/t^* is limited to values greater than 0.035 and less than 0.062.

The relation between strength and duration of a threshold pulse-decrease of intensity, as determined experimentally, is shown in Fig. 12. The points marked by crosses were obtained by observing the phototactic responses to pulses of different strengths and durations. The utilization time was found to be 1.5 sec.; a pulse of this duration was fully as effective as a longer pulse in stimulating the bacteria. The chronaxie, or threshold duration of a pulse of twice the rheobasic strength, was found to be 0.52 sec.

The interval between the start of stimulation and the appear-

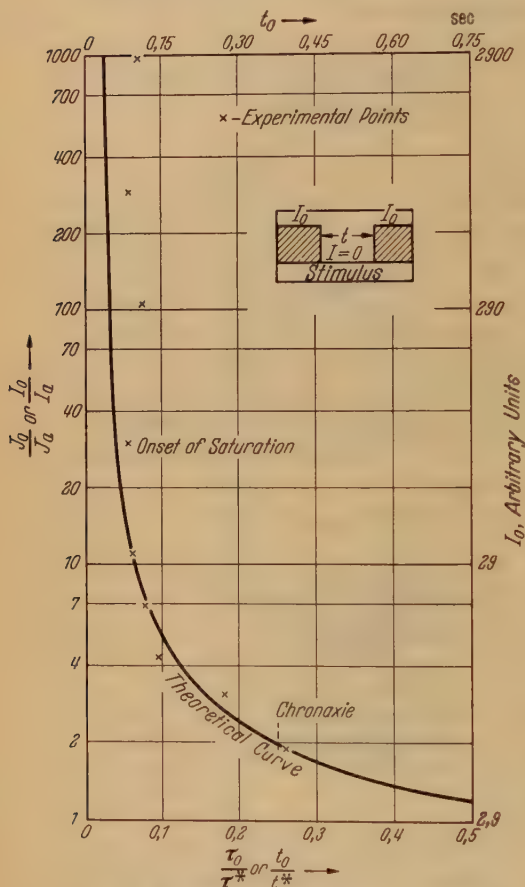


Fig. 13. Relation between threshold strength and duration of a pulse of total darkness, for the phototaxis of *Rhodospirillum rubrum*.

ance of a phototactic response should measure the required duration of the stimulus plus the durations of any other events involved in the overall phototactic process. If these other events are rapid compared with the changes of i and s (or their actual equivalents), a determination of the latent period of the response as a function of the strength of stimulus

should give exactly the same results as a determination of the threshold duration of a stimulating pulse as a function of its strength. The circles in Fig. 12 represent measurements of latency, using a step-decrease of intensity; they are in close agreement with the crosses representing measurements of the threshold pulse-decrease.

Having found the values of t^* (1.5 sec.) and t_0 at $I_0 = 32$ (0.090 sec.) we are in a position to calculate ϱ , γ , τ/t , and J/I ; they were found to be $\varrho = 1.465$, $\gamma = 1.45$, $\tau/t = 0.565$, and $J/I = 2.60$. The theoretical strength-duration curve given by eqn. (6a), with these values of the constants, is included in Fig. 12.

The foregoing investigation of strength *vs.* duration of a threshold pulse-decrease was conducted by keeping the initial intensity I_0 constant and varying the quantity ΔI . Another situation was explored, in which pulses of total darkness were employed and I_0 was varied. The theoretical relation between I_0 and t_0 which describes this case is given by eqn. (9a); it is portrayed in Fig. 13 together with the corresponding experimental data.

B. The Strength-Duration Relation for a Pulse-Increase.

The termination of a very long pulse of increased intensity is equivalent, in its stimulating influence, to a step-decrease of intensity; the threshold strength of such a pulse will equal the threshold strength of a step-decrease (*i. e.*, the rheobase). As the pulse is made shorter its threshold strength becomes greater; we shall now derive the relation between liminal strength and duration of this type of stimulus, as predicted by RASHEVSKY's theory.

The changes of i and s accompanying a pulse-increase of intensity are shown in Fig. 14 for the three cases of below threshold, threshold, and above threshold. Writing eqn. (5) and remembering that in this case $I > I_0$, the values of s and i at the end of a pulse-increase of duration t are

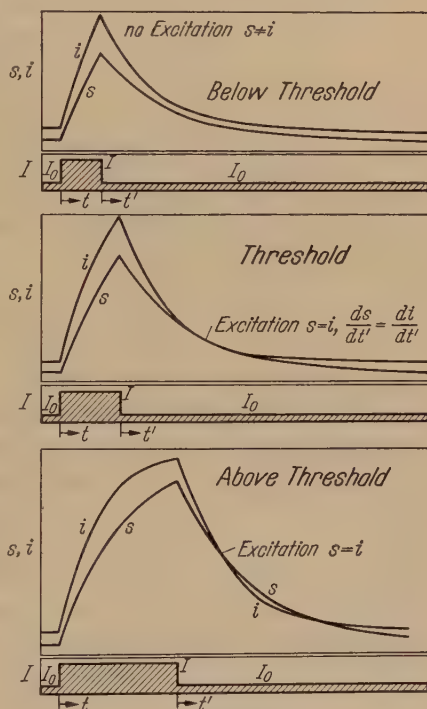


Fig. 14. Explanation in text.

$$\begin{cases} s = s_0 + \frac{K}{k} I (1 - e^{-kt}) + \frac{K}{k} I_0 e^{-kt} \\ i = i_0 + \frac{M}{m} I (1 - e^{-mt}) + \frac{M}{m} I_0 e^{-mt} \end{cases} \quad (16)$$

Denoting by t' the time after termination of the pulse, we can express the values of s and i after the pulse by means of equations (3). The ex-

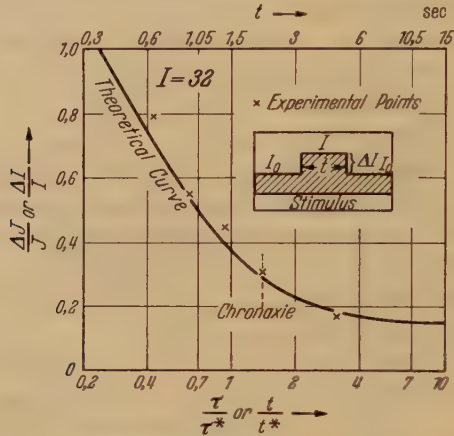


Fig.15. Relation between threshold strength and duration of a pulse-increase of light intensity, for the phototaxis of *Rhodospirillum rubrum*.

pressions for s and i given by (16) are substituted for s_1 and i_1 in eqn. (3); t' is substituted for t , and I is replaced by I_0 . The resulting expressions for s and i after the pulse are

$$\begin{cases} s = s_0 + \frac{K}{k} I_0 + \frac{K}{k} (I - I_0) (1 - e^{-kt}) e^{-kt'} \\ i = i_0 + \frac{M}{m} I_0 + \frac{M}{m} (I - I_0) (1 - e^{-mt}) e^{-mt'} \end{cases} \quad (17)$$

For the case of threshold excitation we require $s = i$ and $ds/dt' = di/dt'$; by applying these conditions to eqn. (17) and eliminating t' we obtain

$$\begin{cases} \Delta I/I = \frac{k(i_0 - s_0)/KI + Mk/Km - 1}{f(t) + Mk/Km - 1} \\ f(t) = (1 - k/m) (K/M)^{\frac{k}{m-k}} \cdot \frac{(1 - e^{-kt})^{\frac{m}{m-k}}}{(1 - e^{-mt})^{\frac{k}{m-k}}} \end{cases} \quad (18)$$

In terms of our dimensionless parameters, (18) becomes

$$\begin{cases} \Delta J/J = \frac{1/J + \varrho/\gamma - 1}{\varnothing(\tau) + \varrho/\gamma - 1} \\ \varnothing(\tau) = (1 - 1/\gamma) (\varrho)^{\frac{1}{1-\gamma}} \cdot \frac{(1 - e^{-\tau})^{\frac{\gamma}{\gamma-1}}}{(1 - e^{-\gamma\tau})^{\frac{1}{\gamma-1}}} \end{cases} \quad (18a)$$

The theoretical curve, a plot of equation (18a), and the experimental results for this case of excitation are presented in Fig. 15.

C. Summation and Accommodation.

If two inadequate stimuli are separated by a short interval, their combined effect may be sufficient to cause excitation. As the interval becomes longer this summation becomes less effective; for very long intervals the influence of the first stimulus is entirely dissipated before the second arrives. There is an intermediate range of intervals in which the excitatory effect of the first stimulus has subsided before the arrival of the second, but the inhibitory influence is still appreciable. In this case the threshold for excitation by the second stimulus is greater than the normal threshold for a single stimulus (GILDEMEISTER effect).

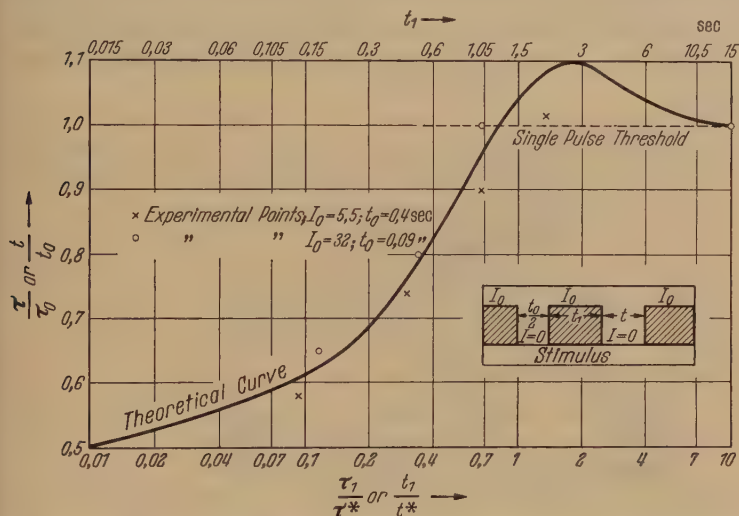


Fig. 16. Threshold duration of a pulse of total darkness applied after various intervals following a pulse of half the threshold duration, for the phototaxis of *Rhodospirillum rubrum*.

This phenomenon is a variant of the more familiar case of accommodation in which a gradually increasing stimulus is less effective than an abrupt one in evoking a response.

The foregoing effects were investigated with pairs of pulses of total darkness. The first pulse was of half the liminal duration t_0 ; after an interval t_1 another pulse was applied and its threshold duration t was determined (see inset of Fig. 16). The relation between t_1 and t for a given value of I_0 (and a corresponding value of t_0) predicted by RASHEVSKY's theory can be derived by appropriate use of eqn. (3) and the criterion $s = i$; in our dimensionless notation the result is

$$1/J_0 = e^{-\tau_0} - \frac{\rho}{\gamma} e^{-\gamma\tau_0} \\ = \left[1 - \left(1 - e^{-\frac{\tau_0}{2}} \right) e^{-\tau_1} \right] e^{-\tau} - \frac{\rho}{\gamma} \left[1 - \left(1 - e^{-\gamma\frac{\tau_0}{2}} \right) e^{-\gamma\tau_1} \right] e^{-\gamma\tau}. \quad (19a)$$

This equation is portrayed in Fig. 16 by a plot of τ/τ_0 vs. τ_1/τ^* , together with the corresponding experimental data. The numerical values relating τ/τ_0 to τ_1/τ^* (or to t_1) turn out to be nearly independent of I_0 over a wide range of the latter, so that one curve suffices for the two values of I_0 employed. As we have anticipated, the threshold duration of the second pulse is $t_0/2$ for very small values of t_1 , t_0 for very large values of t_1 , and greater than t_0 in an intermediate region.

D. Refractoriness.

The refractory condition which follows a response of *Rh. rubrum* is not treated by RASHEVSKY's theory; the chemical balance of the system changes dramatically during the response and no attempt has been made to predict the accompanying changes of the hypothetical quantities i and s .

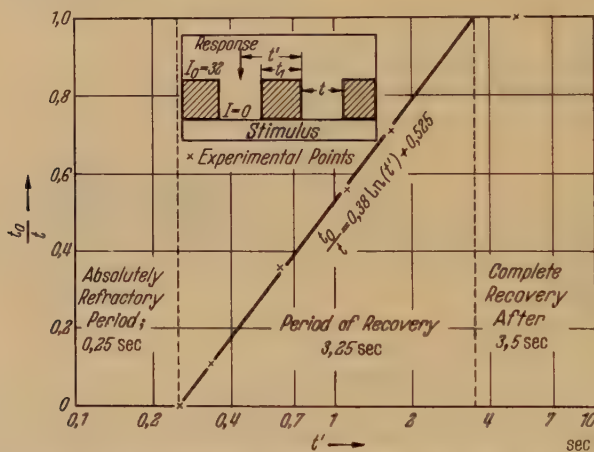


Fig. 17. Recovery of excitability of *Rhodospirillum rubrum* after a phototactic response.

The course of recovery from this refractory condition was followed by applying stimuli at various times after a phototactic response. The method of stimulation is shown in the inset of Fig. 17. A first pulse of total darkness of duration 0.20 sec. was applied to evoke a phototactic response; after an interval t_1 a second pulse was applied and its threshold duration t was determined. Since the pulses were periods of total darkness interrupting an intensity of 32 arbitrary units, the first pulse led to a response after a latent period of about 0.09 sec. (see part A of this section). The second pulse therefore began about $0.20 - 0.09 + t_1$ seconds after a response; this interval, $t_1 + 0.11$ sec., is denoted t' . The reciprocal of the threshold duration of the second pulse was taken as a measure of the excitability of the system during recovery; it is expressed as the ratio t_0/t , where t_0 is the threshold duration after complete recovery.

The observed values of t_0/t at various values of t' are shown in Fig. 17; in the region $0.25 \text{ sec.} \leq t' \leq 1.7 \text{ sec.}$ the relationship is described accurately by equation

$$t_0/t = 0,38 \text{ Ln}(t') + 0,525. \quad (20)$$

For values of t' less than 0.25 sec. the excitability is zero; at $t' = 5 \text{ sec.}$ the excitability is 1.0 , denoting full recovery of the system. Extrapolating eqn. (20) to the value $t_0/t = 1$, we predict that recovery is complete at $t' \geq 3.5 \text{ sec.}$ (A phase of supernormal excitability may have escaped detection in our measurements). Thus we find an absolutely refractory period of 0.25 seconds' duration, followed by a period of recovery lasting 3.25 sec. and characterized by a logarithmic dependence of excitability upon time.

E. Rhythmicity.

Under some conditions of constant stimulation, a nerve fiber exhibits rhythmic behavior; *i. e.*, a series of more or less regularly repeated responses. It was observed that *Rh. rubrum* also displays this property;

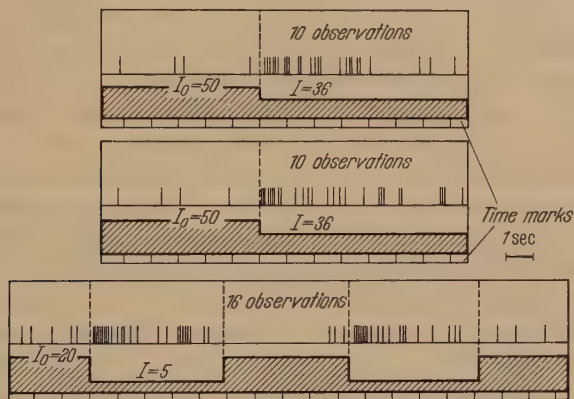


Fig. 18. Superposition of responses of *Rhodospirillum rubrum* under changes of light intensity, illustrating rhythmicity and suppression of response by restoration of higher intensity.

when subjected to a step-decrease of light intensity the organism exhibits not one but a succession of reversals of swimming direction. The initial frequency of these rhythmic responses is about one *per* second;

Fig. 19. Discharges in a single optic nerve fiber from the distal cell layer of the eye of *Pecten irradians* under changes of illumination (H. K. HARTLINE, J. Cell. a. Comp. Physiol. 11, 465 (1938).



it declines steadily until the effect vanishes after about thirty seconds. The activity is suppressed by restoration of the initial light intensity. Averages of this behavior are presented in Fig. 18, in the manner of

Fig. 6 (superposition of a number of individual observations). When represented in this way, the phototaxis of *Rh. rubrum* is strikingly reminiscent of the "off" activity of an optic nerve fiber; a record of the latter is shown in Fig. 19 for comparison.

Discussion.

The results described in the last section have shown, on the whole, a fairly good agreement with RASHEVSKY's theory. The agreement has not been so close, however, as to provide a convincing confirmation of this theory; the same would probably be true for any other current theory of excitation. In any case, our purpose has been not to test RASHEVSKY's theory but to compare bacterial phototaxis with other types of excitation.

To make such a comparison we must choose a procedure for normalizing the parameters of time and stimulating intensity, and we must decide what kinds of data should be comparable. In the comparison of strength-duration curves, time and intensity were normalized by dividing these quantities by the chronaxie and the rheobase, respectively. The comparability of different experimental situations was judged by the predictions of RASHEVSKY's theory. Almost all of the available data on strength *vs.* duration refer to the excitation of some system by a constant pulse of electric current, as in the cathodal stimulation of nerve. Some data are also available for the anodal stimulation of nerve fibers, excitation being caused by the cessation of the inward-flowing current. In terms of RASHEVSKY's theory, the former case is described by an equation identical to eqn. (6), with the fractional decrease of light intensity $\Delta I/I_0$ replaced by the current strength I . The strength-duration curve of *Rh. rubrum* under a pulse-decrease of light intensity should therefore be strictly comparable to curves of the type represented by the cathodal stimulation of nerve fibers. A situation comparable, according to RASHEVSKY's theory, to the stimulation of nerve fibers by an anodal constant current pulse was not examined with *Rh. rubrum*, since it would have entailed practical difficulties of observation. The strength-duration curve predicted for this case has almost the same form, however, as that for cathodal stimulation, when both curves are normalized to chronaxie and rheobase. Because of this similarity, shown in Fig. 20, data for anodal stimulation can be compared directly with those for cathodal stimulation and for the stimulation of *Rh. rubrum* by a pulse-decrease of intensity.

Another pattern of electrical stimulation is the gap in a constant current; termination of the gap causes excitation if the current is cathodal. For this case the strength-duration relation is described by a plot of I (the current strength) *vs.* t (the duration of the gap). For the stimulation

of *Rh. rubrum* by a pulse-increase of light intensity the strength-duration relation is described by a plot of $\Delta I/I$ (the fractional increase of intensity) vs. t (the duration of the pulse). The two curves, I vs. t for nerve excitation and $\Delta I/I$ vs. t for phototaxis, are described by similar equations according to RASHEVSKY's theory; thus these two situations are regarded as comparable.

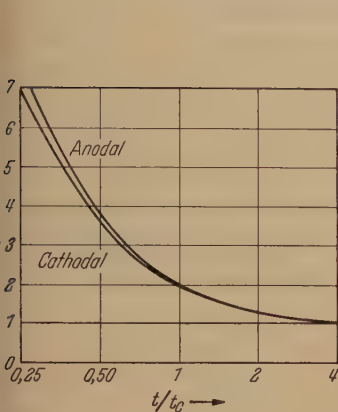


Fig. 20.

Fig. 20. Strength-duration relations for anodal and cathodal constant current pulses, as predicted by RASHEVSKY's theory, normalized to chronaxie and rheobase.

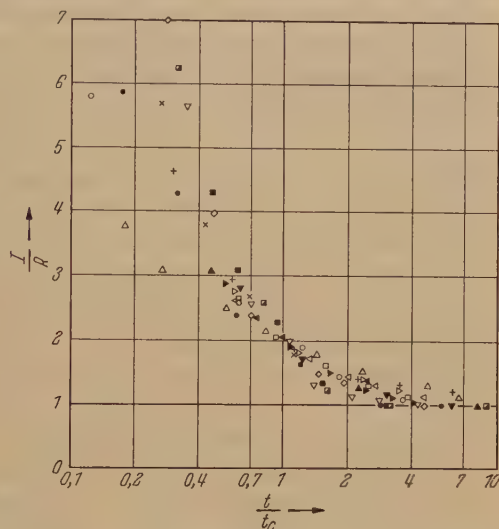


Fig. 21.

Fig. 21. Strength-duration data for the cathodal stimulation of nerve and for comparable stimuli applied to other tissues, normalized to chronaxie and rheobase.

Symbol	Investigator	Material	Chronaxie, sec
○	LAPICQUE	<i>Spirogyra</i>	8.2
●	"	Frog Stomach	0.86
◻	CLAYTON	<i>Rhodospirillum</i>	0.52
◼	HARTLINE	<i>Limulus</i>	0.127
△	MONNIER	Nictitating Membrane, Cat	0.033
▽	LAPICQUE	<i>Aplysia</i>	0.033
◊	"	<i>Helix</i>	0.023
◆	COPPÉE	Toad Sartorius, Direct	0.022
◇	BONHOEFFER	Iron Wire in HNO ₃	0.011
◊	RAMSEY a. STREET	Single muscle Fiber, Frog	0.090
◊	SOLANDT	Frog Sciatic	0.0057
+	LAPICQUE	Frog Sartorius	0.0040
×	"	<i>Vorticella</i>	0.0029
▲	RUHSTON	Frog Sciatic	0.00073
▼	LAPICQUE	Frog Sciatic	0.00062
▼	COPPÉE	Toad Sartorius, Via Nerve	0.00016

Fig. 21 shows a compilation of data representing strength vs. duration of a cathodal constant current pulse in nerve excitation and of comparable stimuli in other cases of excitation. In every case except three the stimulus is a constant current pulse of the cathodal type; i. e., excitation is caused by the onset of the pulse and not by its termination.

SOLANDT's data are for an anodal pulse of current, those of HARTLINE are for a pulse of illumination, and the data pertaining to *Rh. rubrum* are for a pulse-decrease of illumination (the ordinate of Fig. 21 in this case represents $\Delta I/I_0 \div R$). We see that the strength-duration curves for all of these excitable systems, with the exception of *Aplysia*, fall within fairly close limits. Of course, one should not expect too great a diversity among these data. Owing to their normalization, all of the strength-duration curves must pass through the point ($I/R = 2, t/t_c = 1$) and must approach $I/R = 1$ at high values of t/t_c . Some sort of reciprocal relationship between I and t can be expected to hold, so that I/R will

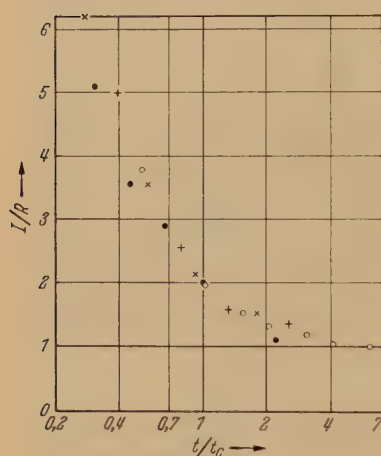


Fig. 22.

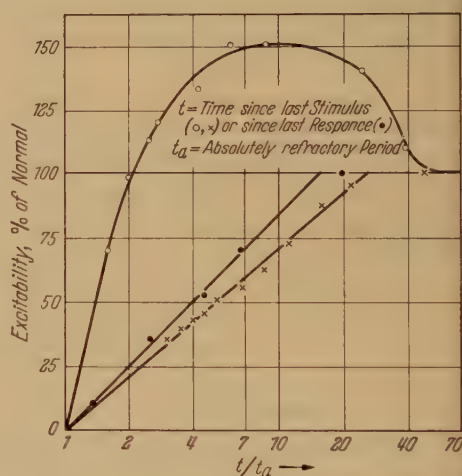


Fig. 23.

Fig. 22. Strength-duration data for the excitation of nerve by a gap in a constant current and of *Rhodospirillum rubrum* by a pulse-increase of light intensity, normalized to chronaxie and rheobase.

Symbol	Investigator	Material	Chronaxie, sec
●	CLAYTON	<i>Rhodospirillum</i>	2.1
×, +	LUCAS	Frog Sciatic	0.0094, 0.0066
○	SOLANDT	" "	0.0039

Fig. 23. Recovery of excitability of nerve and of *Rhodospirillum rubrum* after excitation.

Symbol	Investigator	Material	t_a , sec
●	CLAYTON	<i>Rhodospirillum</i>	0.25
×	ADRIAN	Frog Sciatic	0.001
○	GASSER and GRUNDFEST	Cat Saphenous	0.0004

increase as t/t_c becomes smaller. In view of these facts, the data of Fig. 21 can hardly be taken as a convincing argument for the uniformity of mechanism in all excitable systems. On the other hand, the data do not vitiate such a notion, since their differences could be due to effects having nothing to do with the basic irritable mechanism. It is at least note-

worthy that the data obtained in the present studies on the phototaxis of *Rh. rubrum* are in line with those for most excitable systems.

A closer agreement is found between data describing excitation of nerve by a gap in a constant cathodal current and the comparable excitation of *Rh. rubrum* by a pulse-increase of light intensity (Fig. 22). Of course, the coherence of these data could be fortuitous, since they represent only three different investigations.

Turning to the recovery of excitability during the relatively refractory period, we find a similarity between our data and some obtained by ADRIAN for the excitation of the sciatic nerve of the frog (Fig. 23). These data are quite different, however, from those of GASSER and GRUNDFEST for the excitation of the saphenous nerve of the cat, which show a much more rapid recovery and a long period of supernormal excitability (other data of ADRIAN reveal a slight supernormal phase).

In summary, we find the following effects, characteristic of irritable tissues, in the phototaxis of *Rh. rubrum*: 1. All-or-none response. — 2. Refractoriness and recovery. — 3. Summation and GILDEMEISTER effect (accommodation). — 4. Rhythmic behavior. — 5. Existence of utilization time and rheobase.

The relations between strength and duration of various types of threshold stimulus are described reasonably well by the theories of RASHEVSKY and HILL; the values of characteristic durations are:

Chronaxie for pulse-decrease of intensity.	0,52 sec
Utilization time for pulse-decrease of intensity.	1,5 sec
Greatest internal of efficient summation (approx.)	0,3 sec
Minimum period of rhythmic behavior (approx.)	1,0 sec
Absolutely refractory period	0,25 sec
Relatively refractory period	3,25 sec

The kinetics of excitation bear a close resemblance to those of nerve fibers, with a difference in the time scale of about a thousandfold.

Neither convincing support nor contradiction has been found for the hypothesis that all excitable tissues share a common mechanism for irritability, with differences in the time scale resulting from differences in constitution. However, there is a strong similarity between the phototaxis of *Rh. rubrum* and other micro-organisms and the visual processes of higher animals. In both cases carotenoid pigments can receive light energy which is used, after some chemical mediation, to excite an "irritable system". This system exhibits properties which are the same in both cases (phototaxis and vision), quantitatively as well as qualitatively, except for a difference in the time scale. Thus it can be hoped that information about the chemical mediation of phototaxis will aid our understanding of the visual process.

In this connection it is interesting to compare the phototaxis of purple bacteria with that of algae and other cells. Tables compiled by MAST and by WATERMAN show the spectral regions of greatest phototactic activity for a wide variety of organisms; the maxima are all in the region of carotenoid absorption. Although many types of algae are represented, none show phototactic activity mediated by chlorophyll. Apparently the only exception to the uniqueness of carotenoids as phototactically active pigments is found in the purple bacteria, in which the activity due to bacteriochlorophyll is much stronger than that due to carotenoids. Moreover, energy absorbed by carotenoids in purple bacteria appears to be effective for phototaxis only after it has been transferred to bacteriochlorophyll. This is indicated by the similarity between action spectra for phototaxis of purple bacteria and corresponding action spectra for the fluorescent transfer of energy from carotenoids to bacteriochlorophyll (DUYSENS) and also by the abundant evidence (CLAYTON 1953b, DUYSENS, MANTEN) that phototaxis and photosynthesis are intimately related processes.

We are faced, then, with an apparent duality of mechanism between the phototaxis of purple bacteria and that of algae, arising from differences in the mechanism of photosynthesis. The phototaxis of algae appears to bear a closer similarity to the visual process of a vertebrate than does the phototaxis of purple bacteria. It has been suggested by WALD and BROWN that the visual process is mediated through an oxidation potential which arises when sulfhydryl radicals are exposed by the dissociation of carotenoid molecules from the proteins to which they have been conjugated. If this mechanism prevails in the phototaxis of algae it might exist also in the purple bacteria, being overshadowed by a much stronger effect of the same kind arising from powerful oxidizing or reducing substances which are involved in photosynthesis.

If a bacteriochlorophyll-free mutant of a purple bacterium can be produced, it will be of interest to determine its capacity for phototaxis.

Summary.

The threshold strength-duration relationships were determined for the phototactic excitation of *Rhodospirillum rubrum* by various pulses and pairs of pulses of change in light intensity. The recovery of excitability after a response was followed, and examples of rhythmic behavior were recorded.

Experimental results were found to be in fair agreement with data for other irritable systems and with the predictions of the theories of RASHEVSKY and HILL.

The hypothesis was considered that all excitable systems might share a common mechanism for irritability, and the phototactic mechanisms of various unicellular organisms were discussed in this connection.

Acknowledgements. The author wishes to thank Prof. C. B. VAN NIEL for his stimulating and helpful supervision. Having performed this investigation under the tenure of a Merck Postdoctoral Fellowship, the author is grateful to the Merck Foundation for its financial support.

References.

- BLAIR, H. A.: J. Gen. Physiol. **15**, 709 (1932). — CLAYTON, R. K.: Arch. f. Mikrobiologie **19**, 107 (1953a); **19**, 125 (1953b). — DUYSSENS, L. N. M.: Transfer of excitation energy in photosynthesis; Thesis, Utrecht 1952. — HILL, A. V.: Proc. Royal. Soc. B, **119**, 305 (1936). — MANTEN, A.: Phototaxis, phototropism, and photosynthesis in purple bacteria- and blue-green algae. Thesis, Utrecht 1948. — MAST, S. O.: J. Exper. Zool. **22**, 471 (1917). — OFFNER, F.: J. Gen. Physiol. **21**, 89 (1937). — RASHEVSKY, N.: Protoplasma **20**, 42 (1933). — WALD, G., and P. K. BROWN: J. Gen. Physiol. **35**, 797 (1952). — WATERMAN, T. H.: J. Cell. Comp. Physiol. **9**, 453 (1936).

Berichtigung.

In Fig. 23 lies statt Response Response.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen und dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Göttingen.)

Über Abbau und Regeneration der Chloroplastenfarbstoffe bei *Chlorella*.

Von

H. G. AACH.

(Eingegangen am 5. November 1952.)

Bereits häufiger ist beobachtet worden, daß die Chloroplastenfarbstoffe bei Stickstoffmangel gegen starke Beleuchtung besonders empfindlich sind (STEEMANN-NIELSEN, 1940; MONTFORT, 1950; dort weitere Literatur). Die folgenden Untersuchungen stellen ein quantitatives Studium dieser Erscheinungen dar.

Methodik.

Als Versuchsobjekt diente *Chlorella pyrenoidosa*. Sie wurde unter Stickstoffmangelbedingungen in Kulturröhren gezogen, in die von unten ein kräftiger Luftstrom eingeblasen wurde, dem 5% Kohlendioxyd zugemischt waren (HARDER u. v. WITSCH, 1942). Die Nährlösung (1400 cm³ je Kultur) enthielt 1×10^{-3} m KNO₃; 5×10^{-4} m MgSO₄; 3×10^{-4} m KH₂PO₄; 1×10^{-5} m Eisencitrat und 5×10^{-7} m MnCl₂. Die Kulturtemperatur betrug $25^\circ \text{C} \pm 1^\circ$. Die Lichtquellen, Leuchtstofflampen HNG, befanden sich innerhalb der Nährlösung (AACH, 1952). Die dauernd eingestrahlte Lichtleistung je Kultur betrug zu Anfang 1,6 Watt; während des Versuchs eingetretene Unterschiede in der Lichtemission der Lampen wurden durch regelmäßiges Vermischen der Parallelkulturen ausgeglichen. Wie bereits früher mitgeteilt (AACH, a. O.), stellen die Algen unter diesen Versuchsbedingungen die Zellteilungen nach 5 Tagen infolge Stickstoffmangels ein, so daß in der Folge der in der Zeiteinheit auf eine Zelle entfallende Anteil der Lichtenergie konstant bleibt. Bei längerer Kultur scheiden die Algen Hemmstoffe (PRATT, 1940; SPOEHR u. Mitarb., 1949) in die Nährlösung ab, so daß dann auch bei Stickstoffzusatz keine Teilungen mehr erfolgen.

Zur Farbstoffextraktion wurden die Algen scharf abzentrifugiert, die überstehende Nährlösung wurde abgegossen und der Rückstand bei Zimmertemperatur dreimal mit gereinigtem Methanol und einmal mit gereinigtem Petroläther vollständig extrahiert. Die Chlorophylle wurden im Methanolauszug mit dem BECKMAN-Spektralphotometer bestimmt. Die Berechnung der Konzentration c erfolgte nach den Formeln (vgl. RUDOLF, 1934)

$$c_b = \frac{E_2 \cdot \alpha_{a1} - E_1 \cdot \alpha_{a2}}{\alpha_{b2} \cdot \alpha_{a1} - \alpha_{b1} \cdot \alpha_{a2}} \quad \text{und} \quad c_a = \frac{E_1 - \alpha_{b1} \cdot c_b}{\alpha_{a1}}$$

unter Benutzung der dekadischen Extinktionskoeffizienten α von MACKINNEY (1941) für $\lambda_1 = 665 \text{ m}\mu$ und $\lambda_2 = 650 \text{ m}\mu$. Anschließend wurde die Methanollösung durch Wasserzusatz auf 90% verdünnt und wiederholt mit Petroläther ausgeschüttelt;

dadurch wurden die Carotine von den Xanthophyllen abgetrennt. Um etwa vorhandene Fettsäureester von Carotinoiden zu erfassen, die sich bei der Entmischung wie Carotine verhalten, wurden die vereinigten Petrolätherextrakte mit dem gleichen Volumen 5% alkohol. KOH versetzt und 3 Std bei 40°C aufgehoben (KUHN u. BROCKMANN, 1932). Anschließend wurde nochmals wie vor entmischt. Die Xanthophylle wurden nach Verseifen des Chlorophylls durch Wasserezusatz zur Methanolösung in Hexan (65—67°, durch Fraktionierung von Petroläther) übergeführt. Carotine und Xanthophylle wurden sofort nach der Trennung bei $\lambda = 427 \text{ m}\mu$ photometriert, da sich die Extinktionskurven der isomeren Carotinoide an diesem Punkt schneiden (ZSCHEILE u. Mitarb., 1942). Zur Berechnung der Konzentration wurden die Extinktionskoeffizienten von ZSCHEILE u. Mitarb. (1942) benutzt. Die Xanthophylle wurden als Lutein berechnet. — Die Lipide wurden, wie bereits früher beschrieben (AACH, 1952), durch Extraktion in der Siedehitze abwechselnd mit Methanol und nicht-wasserlöslichen Lösungsmitteln vollständig erhalten. — Der Eiweißgehalt wurde in der üblichen Weise durch Multiplikation des nicht-löslichen Stickstoffs (Bestimmung nach KJELDAHL) mit dem Faktor 6,25 berechnet. — Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurde eine kleine Menge Substanz bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank bei 105°C gehalten.

Versuchsergebnisse.

Zur Beimpfung der Kulturröhren wurden Zellen aus einer älteren *Chlorellakultur* benutzt, in der infolge großer Individuenzahl auf die Einzelzelle im Mittel nur eine sehr geringe Lichtleistung entfiel. Diese Zellen enthielten im Durchschnitt $30,4 \times 10^{-14} \text{ g}$ Farbstoffe (Chlorophylle und Carotinoide) = 4,62% der Trockensubstanz bei einem Eiweißgehalt von $2,6 \times 10^{-12} \text{ g} = 39,5\%$ und einem Lipoidgehalt (ohne die Farbstoffe) von $1,1 \times 10^{-12} \text{ g} = 17,0\%$ der Trockensubstanz (siehe Tab. 1). Wie schon in einer früheren Arbeit mitgeteilt (AACH, 1952), sind unter den vorliegenden Bedingungen die geringen Mengen assimilierbaren Stickstoffs am 4. Tage erschöpft. Aus Tab. 1 ist ersichtlich, daß sich zu diesem Zeitpunkt bereits die ersten Anzeichen des Stickstoffmangels in der chemischen Zusammensetzung der Zellen am Absinken des Gehalts an Eiweiß und Farbstoffen und am Anstieg des Lipoidgehaltes

Tabelle 1. *Chlorella pyrenoidosa*. Zusammensetzung der Zellen in Stickstoffmangelkultur bei Dauerlicht.

Alter der Kultur Tage	Chloroplastenfarbstoffe		Eiweiß		Lipide (ohne Farbstoffe)	
	je Zelle 10^{-14} g	% der Trocken- substanz	je Zelle 10^{-12} g	% der Trocken- substanz	je Zelle 10^{-12} g	% der Trocken- substanz
0	30,4	4,62	2,60	39,54	1,1	17,0
4	13,4	2,53	1,50	28,23	1,3	25,0
6	7,7	1,37	1,05	18,70	2,2	38,4
10	3,6	0,49	0,97	12,90	3,9	53,5
15	2,3	0,22	0,95	9,31	6,5	62,5
25	1,3	0,115	0,89	7,81	7,9	69,2
39	0,49	0,049	0,79	7,87	6,7	67,3
57	0,25	0,039	0,72	11,21	3,5	54,2

bemerkbar machen. Die Durchschnittszelle enthielt noch $13,4 \times 10^{-14}$ g Farbstoffe, das sind 44% der Farbstoffmenge einer Alge zu Beginn der Kultur. In den folgenden Tagen sank der Farbstoffgehalt rasch weiter ab. Am 10. Tag waren es nur noch ungefähr 12%, die bis zum 57. Tag (Schluß des Versuchs) auf $0,25 \times 10^{-14}$ g = 0,8% der ursprünglichen Menge zurückgingen. Da die Zellteilungen schon am 5. Tag eingestellt worden waren, handelt es sich also nicht etwa um eine Verteilung des vorhandenen Farbstoffs auf eine größere Anzahl von Zellen, sondern um einen Abbau der Farbstoffe. Der Eiweißgehalt sank gleichzeitig bis auf $0,72 \times 10^{-12}$ g, während der Lipoidgehalt bis zum 25. Tag der Kultur auf $7,9 \times 10^{-12}$ g angewachsen war.

Auch die Zellen mit dem niedrigsten Gehalt an Chloroplastenfarbstoffen vermochten auf Stickstoffzusatz, $0,5 \text{ n } (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, innerhalb weniger Stunden wieder zu ergrünen. Diese Regeneration ging im Licht schneller vor sich als im Dunkeln (siehe Tab. 2 u. 3). Zusatz von KH_2PO_4 oder Eisencitrat ließ keinen Einfluß auf die Regeneration der Farbstoffe erkennen. Auf Zusatz von $0,5 \text{ n } (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ kam es nicht zu einem Wiedereinsetzen der Zellteilungen, obwohl der Eiweißgehalt der Zellen stark anstieg (Tab. 2).

Tabelle 2. *Chlorella pyrenoidosa*. Nach 39 Tagen Kultur im Dauerlicht Regeneration der ausgebleichenen Farbstoffe im Licht nach Zusatz von $0,5 \text{ n } (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Nach N-Zusatz Std	Chlorophylle je Zelle 10^{-14} g	$\frac{a}{b}$	$\frac{a+b}{K+X}$	Carotinoide je Zelle 10^{-14} g	$\frac{X}{K}$	Eiweiß je Zelle 10^{-12} g	Lipide je Zelle 10^{-12} g
0	0,20	5,6	0,69	0,29	7,0	0,79	6,73
8	0,19	1,8	0,66	0,29	6,9	1,24	nicht bestimmt
24	1,8	5,9	3,3	0,55	6,6	1,93	6,11

Das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Farbstoffe wird besonders deutlich durch die Änderungen der Gewichtsverhältnisse der Komponenten, die in Tab. 4 aufgeführt sind. Aus dem starken Absinken des Verhältnisses $\frac{\text{Chlorophylle}}{\text{Carotinoide}} \left(\frac{a+b}{K+X} \right)$ geht hervor, daß die grünen Farbstoffe durch das Licht weitaus stärker angegriffen werden als die gelben. Während zu Beginn der Versuche eine Zelle 8,5 mal mehr Chlorophylle als Carotinoide enthielt, waren nach 50 tägiger Kultur 1,6 mal soviel Carotinoide wie Chlorophylle vorhanden. Bei der Regeneration der Farbstoffe wurde die Chlorophyllbildung bevorzugt, so daß sich das Verhältnis wieder umkehrte. Von den Chlorophyllen wurde das Chlorophyll *a* anfangs stärker abgebaut, so daß das Verhältnis $\frac{\text{Chlorophyll } a}{\text{Chlorophyll } b} \left(\frac{a}{b} \right)$ innerhalb 15 Tagen von seinem Anfangswert 6,5 auf 2,2 gesunken war. Von da ab stieg das Verhältnis jedoch infolge stärkeren Abbaus der *b*-Komponente bis zum 50. Tag wieder auf 5,8 an. Bei der

Regeneration finden wir wieder die Umkehr der Reihenfolge während des Abbaus. Das Absinken des Komponentenverhältnisses bedeutet eine anfänglich stärkere Synthese von Chlorophyll *b*. Im Licht (Tab. 2) wurde sogar innerhalb der ersten 8 Std noch ein Rückgang von Chlorophyll *a* beobachtet, das aber anschließend schneller wieder aufgebaut wurde als Chlorophyll *b*. Da die Rückbildung der Farbstoffe im Licht verhältnismäßig rasch vor sich geht, wird der Vorgang durch die Werte der Dunkelregeneration (Tab. 3) besser verdeutlicht.

Tabelle 3. *Chlorella pyrenoidosa*. Nach 49 Tagen Kultur im Dauerlicht Regeneration der ausgebleichenen Farbstoffe im Dunkeln nach Zusatz von 0,5 n $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Nach N-Zusatz Std	Chlorophylle je Zelle 10^{-14} g	$\frac{a}{b}$	$\frac{a+b}{K+X}$	Carotinoide je Zelle 10^{-14} g	$\frac{X}{K}$
0	0,17	5,8	0,62	0,25	5,7
24	0,53	4,6	1,73	0,31	7,2
48	2,2	4,7	6,4	0,34	7,4
96	4,2	5,4	6,2	0,68	4,3
104	4,5	5,6	6,2	0,73	4,0

Ein ganz ähnliches Bild bietet der Abbau der Carotinoide. Hier sind es die Carotine, die im Anfang so viel schneller verschwinden, daß das Verhältnis $\frac{\text{Xanthophylle}}{\text{Carotine}} \left(\frac{X}{K} \right)$ (siehe Tab. 4) von 3,2 bis zum 25. Tag der Kultur auf 15,6 ansteigt. Im weiteren Verlauf sinkt der Wert dann wieder auf 5,9. Bei der Regeneration tritt wieder der umgekehrte Verlauf ein: Erst geht die Carotinsynthese schneller vonstatten (vgl. v. EULER u. HELLSTRÖM, 1929) als die des Xanthophylls, später ist es umgekehrt. Fettsäureester der Carotinoide, die bei der herbstlichen Laubverfärbung sehr verbreitet auftreten, konnten während dieser Versuche in keinem Fall beobachtet werden, obwohl in den Algen doch gleichzeitig mit dem Farbstoffabbau große Mengen Neutralfett synthetisiert wurden (Tab. 1). Es handelt sich in beiden Fällen offenbar um verschiedene Vorgänge.

Tabelle 4. *Chlorella pyrenoidosa*. Abbau der Chloroplastenfarbstoffe bei Dauerlicht im Stickstoffmangel.

Alter Tag	Chlorophylle je Zelle 10^{-14} g	$\frac{a}{b}$	$\frac{a+b}{K+X}$	Carotinoide je Zelle 10^{-14} g	$\frac{X}{K}$
0	27,2	6,5	8,5	3,2	3,2
4	11,2	3,5	5,1	2,2	4,9
6	6,1	2,9	4,0	1,5	6,6
10	2,6	2,4	2,5	1,0	6,9
15	1,4	2,2	1,5	0,93	7,6
25	0,75	2,5	1,36	0,56	15,6
39	0,20	5,6	0,69	0,29	7,0
57	0,10	5,8	0,70	0,15	5,9

In einem weiteren Versuch wurden die Kulturen beim Auftreten der Stickstoffmangelercheinungen verdunkelt. Nachdem der Nährlösung 1,5% Saccharose zugesetzt und die Beimischung von CO₂ zur Durchlüftung eingestellt war, wurden die Algen 7 Tage lang im Dauerdunkel gehalten und auf Veränderungen der Farbstoffe untersucht (Tab. 5). Ein nennenswerter Verlust an Farbstoffen oder eine wesentliche Verschiebung in der Zusammensetzung wurde während dieser Zeit nicht beobachtet.

Tabelle 5. *Chlorella pyrenoidosa*.

Alter Tage	Chlorophylle je Zelle 10 ⁻¹⁴ g	Farbstoffgehalt einer Kultur, die nach 5 Tagen Anzucht im Dauerlicht (Temperatur 25 °C) bei den ersten Anzeichen von Stickstoffmangel unter Zusatz von 1,5% Saccharose zur Nährlösung im Dauerdunkel (Temperatur 18°) weitergezogen wurde.
5	18,9	
6	16,5	
7	17,4	
10	16,4	
12	16,6	

Besprechung der Versuche.

In den vorstehend beschriebenen Versuchen wurde bei *Chlorella pyrenoidosa* unter Stickstoffmangelbedingungen ein Abbau der Farbstoffe beobachtet, bei dem — wenigstens zu Anfang — stets die weniger oxydierten Farbstoffe am stärksten angegriffen wurden. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Zerstörung der Farbstoffe durch Oxydationen begonnen wird. Daß im Dunkeln der Stickstoffmangel bei *Chlorella* nicht zum Farbstoffabbau führte, zeigt eindeutig, daß es sich um eine Lichtschädigung handelte.

Auf ganz ähnliche Verhältnisse beim Abbau der Chloroplastenfarbstoffe lassen die Werte schließen, die EGLE (1944) von höheren Pflanzen nach Behandlung mit UV-reichem Licht erhielt. Nach den Ergebnissen von WANGERMANN und LACEY (1952) muß man annehmen, daß es neben dem photochemisch stark wirksamen kurzwelligen Licht das gebildete Ozon gewesen ist, das die Zerstörung der Farbstoffe in EGLES Versuchen einleitete. EGLE konnte ferner zeigen, daß es in einigen höheren Pflanzen bei Dauerdunkelheit zu einem Farbstoffabbau mit ähnlichen Gesetzmäßigkeiten wie in den vorstehend genannten Versuchen kommt. Offenbar greifen diese Pflanzen in Hungerperioden auch die Chloroplastenfarbstoffe oxydativ an.

In unseren Algenversuchen sank gleichzeitig mit dem Farbstoff auch der Eiweißgehalt der Zellen (siehe Tab. 1). Es liegt nahe, hier Zusammenhänge zu suchen, da in den Chloroplasten vermutlich eine — wegen der leichten Extrahierbarkeit wohl nur lockere — Bindung der Farbstoffe an Eiweißstrukturen besteht. Ein stöchiometrisches Verhältnis, das z. B. E. L. SMITH (1941) und SIDERIS (1947) annehmen, ist allerdings — wie unten noch näher ausgeführt wird — kaum zu erwarten. Selbst wenn man nur die Abnahme des Farbstoff- und Eiweißgehaltes der Zellen nach Einstellung der Zellteilungen, in unseren Versuchen vom

6. Tag an, jeweils zu einander in Beziehung setzt, findet man kein konstantes Verhältnis. Da neben dem Chlorophyll auch die stickstofffreien Carotinoide angegriffen werden, kann es sich nicht um direkte Auswirkungen des fehlenden Stickstoffs handeln, sondern es muß eine Sekundärerrscheinung sein, die vielleicht auftritt, weil Fermente oder Eiweißträger der Farbstoffe, die dem Verschleiß unterliegen, nicht ersetzt werden können. Ausreichend mit assimilierbarem Stickstoff versorgte Pflanzen enthalten auch bei starker Beleuchtung viel Farbstoffe (SIDERIS u. YOUNG, 1947). Da der Stickstoff als solcher nicht wirksam werden kann, muß es Eiweiß sein, das die Farbstoffe gegen Lichtschädigung stabilisiert. Auf der anderen Seite weiß man aber, daß unter den höheren Pflanzen Sonnenpflanzen weniger Farbstoff enthalten als Schattenpflanzen (SEYBOLD, 1934; BECK, 1938 u. a.); auch die der Sonne ausgesetzten Blätter eines Baumes sind farbstoffärmer als die Schattenblätter. Setzt man Schattenpflanzen oder Schattenblätter starkem Licht aus (MONTFORT, 1941; GESSNER u. DIEHL, 1951), so bleichen die Chloroplastenfarbstoffe zum Teil aus. Beide Erscheinungen lassen sich nun leicht miteinander in Verbindung bringen.

Gewiß sind die Chloroplastenfarbstoffe auch in den Pflanzen nur so lange stabil, als die von ihnen absorbierte Energie innerhalb einer gewissen Zeit abgeleitet werden kann. Wenn wir nun als Acceptor einen in den vorbeschriebenen Versuchen wirksamen Eiweißkörper, Träger-substanz oder Ferment, annehmen, der die absorbierte Energie womöglich gleich auf energiereiche Phosphat- oder Mercaptanverbindungen überträgt, so wären damit sowohl die vielfach beobachteten stabilisierenden Eigenschaften des Stickstoffs auf die Farbstoffe als auch deren erwiesene Lichtempfindlichkeit bei Mangel an Stickstoff erklärt. Dieser Eiweißkörper stellt mithin einerseits den begrenzenden Faktor für die Kohlensäureassimilation dar, denn von seiner Fähigkeit hängt es ab, wieviel Lichtenergie je Zeiteinheit chemisch gebunden werden kann; zum zweiten bestimmt er in Wechselwirkung mit dem Licht den Farbstoffgehalt der Chloroplasten. Bei geringem Quanteneinfall reicht sein Übertragungsvermögen zur Stabilisierung einer großen Zahl von Chlorophyllmolekeln aus. Dagegen wird sein Übertragungsvermögen bei großem Quanteneinfall infolge starker Beleuchtung bereits durch die Energie, die von nur einem Teil der Farbstoffmolekeln absorbiert wird, voll in Anspruch genommen. Die von den restlichen Molekeln aufgenommene Energie kann nicht abgeleitet werden, die betreffenden Molekeln sind nun inaktiv. Es tritt demnach ein Gleichgewicht ein zwischen der Energie, die durch noch aktive Molekeln aufgenommen wird, und der Energie, die abgeleitet und chemisch gebunden werden kann. Die Inaktivierung, die wohl eine Vorstufe zur Zerstörung darstellt, kann unter für den Nachweis günstigen Bedingungen beim plötzlichen

Umschalten von Stark- auf Schwachlicht bis zu 30 min lang beobachtet werden (STEEMANN NIELSEN, 1942 u. 1949). Auch von WARBURG und Mitarbeitern (1951) mitgeteilte Untersuchungsbefunde können abweichend von der Deutung der Autoren als Nachweis von Farbstoffmolekeln angesehen werden, deren Inaktivierung durch vorhergegangenes stärkeres Licht im Schwachlicht noch 2—3 min lang nachwirkt. Unter anhaltenden Starklichtbedingungen wird dann also nur ein Teil der absorbierten Energie wirklich perzipiert.

Damit besitzt die Pflanze neben der Ausgestaltung der Epidermis (BÜNNING, 1947; MONTFORT, 1950), der Blatorientierung (z. B. *Lactuca serriola* und *Eucalyptus*) und der Chloroplastenanordnung (STEEMANN NIELSEN, 1940) eine weitere Möglichkeit zur Adaptation an das Licht. — Stickstoffmangel beeinträchtigt die Ergänzung des Eiweißkörpers, der offenbar einer Abnutzung unterliegt. Bis zur Erreichung eines neuen Gleichgewichtes werden weitere Farbstoffmolekeln inaktiv. Genetische Unterschiede in der Menge oder den Fähigkeiten dieser Eiweißkörper würden neben den genannten anderen Eigenschaften die bekannten, erblich fixierten Unterschiede zwischen Licht- und Schattenpflanzen (HARDER, 1933) bedingen. Auf diese Weise wird es schließlich auch verständlich, warum der Chlorophyllgehalt normalerweise so wenig Beziehungen zur „Photosyntheserate“ zeigt (WILLSTÄTTER u. STOLL, 1918).

Zusammenfassung der Ergebnisse.

In Stickstoffmangelkulturen von *Chlorella pyrenoidosa* wurde das Verhalten der Farbstoffe beim Ausbleichen durch das Licht verfolgt. Dabei wurden die Chlorophylle stärker angegriffen als die Carotinoide; das Verhältnis $\frac{a+b}{K+X}$ sank von 8,5 auf 0,7. Sowohl unter den Chlorophyllen als auch unter den Carotinoiden wurden die weniger oxydierten Komponenten schneller abgebaut. Xanthophyllester traten nicht auf. Ein stöchiometrisches Verhältnis zwischen dem Farbstoffabbau und dem gleichzeitigen Absinken des Eiweißgehaltes konnte nicht beobachtet werden. Auf Zusatz von Stickstoffverbindungen stieg der Eiweißgehalt wieder an, und die Farbstoffe wurden zurückgebildet, ohne daß es zu Zellteilungen kam.

Literatur.

- AACH, H. G.: Arch. Mikrobiol. **17**, 213 (1952). — BECK, W. A.: Plant Phys. **13**, 871 (1938). — BÜNNING, E.: In den Wäldern Nordsumatras. Bonn 1947. — EGLE, K.: Bot. Arch. **45**, 93 (1944). — EULER, H. v., u. H. HELLSTRÖM: Z. physiol. Chem. **183**, 177 (1929). — GESSNER, FR., u. A. DIEHL: Arch. Mikrobiol. **15**, 439 (1951). — HARDER, R.: Planta **20**, 699 (1933). — HARDER, R., u. H. v. WITSCH: Ber. dtsh. Bot. Ges. **60**, 142 (1942). — KUHN, R., u. H. BROCKMANN: Z. physiol. Chem. **206**,

41 (1932). — MACKINNEY, G.: J. Biol. Chem. **140**, 315 (1941). — MONTFORT, C.: *Planta* **32**, 121 (1941); **38**, 499 (1950). — PRATT, R., and J. FONG: *Amer. J. Bot.* **27**, 439 (1940). — RUDOLPH, H.: *Planta* **21**, 104 (1934). — SEYBOLD, A.: *Planta* **21**, 251 (1934). — SIDERIS, C. P.: *Plant Phys.* **22**, 160 (1947). — SIDERIS, C. P., and H. Y. YOUNG: *Plant Phys.* **22**, 97 (1947). — SMITH, E. L.: *J. Gen. Physiol.* **24**, 565 (1941). — SPOEHR, H. A., J. H. C. SMITH, H. H. STRAIN, H. W. MILNER and G. J. HARDIN: *Carnegie Inst. Wash. Publ.* 586 (1949). — STEEMANN NIELSEN, E.: *Dansk. Bot. Ark.* **10**, Nr. 2 (1940); **11**, Nr. 2:1 (1942); *Phys. Plant.* **2**, 247 (1949). — WANGERMANN, E., and H. J. LACEY: *Nature* **170**, 126 (1952). — WARBURG, O., H. GELEICK u. K. BRIESE: *Z. Naturforschg.* **6b**, 417 (1951). — WILLSTÄTTER, R., u. A. STOLL: *Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure*. Berlin 1918. — ZSCHEILE, F. P., J. W. WHITE, B. W. BEADLE and J. R. ROACH: *Plant Phys.* **17**, 331 (1942).

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut in Göttingen.)

Über die Organisation der Cyanophyceenzelle*.

Von

EVA MARIA VON ZASTROW.

Mit 27 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. Januar 1953.)

Gegenüber der bekannten „klassischen“ Auffassung vom Bau der Cyanophyceenzelle (BAUMGÄRTEL, 1920, GEITLER, 1932, 1936)¹ ist DRAWERT (1949, hier auch Diskussion der neueren Literatur) durch eigene Beobachtungen an *Oscillatoria Borneti* und durch Literaturstudien zu einem wesentlich anderen „möglichen Bild“ der Struktur der Blaualgenzelle gekommen:

Die gesamte plasmatische Grundsubstanz ist chlorophyllhaltig. Der Chromidialapparat ist bei normalen *Oscillatorien*, *Anabaena*- und *Tolypothrix*-Arten in der Mitte der Zelle in plasmatische Grundsubstanz eingebettet, bei *Oscillatoria Borneti* finden sich statt dessen nur einzelne Körnchen, die mit der FEULGEN-Methode eine positive Nuclealreaktion geben; vereinzelt bleibt auch diese aus. „Mit Zellsaft gefüllte Vacuolen besitzen die Cyanophyceen in ihrer normalen Ausbildung nicht. In gewisser Beziehung kann man nur die Zentralsubstanz (= Endoplasten) als ein System von Vacuolen betrachten, die aber nicht mit Zellsaft, sondern mit einem Gel — wahrscheinlich vorwiegend Glykogen — gefüllt sind. Diese meist in der Zellmitte liegende farblose Zentralsubstanz bedingt die schwächere Pigmentierung des zentralen Zellteils und verführt so zur Unterscheidung zwischen Chromatoplasma und farblosem Centroplasma. Bei *Oscillatoria Borneti* füllt die Zentralsubstanz die ganze Zelle aus und bedingt so die Keritomie“ (S. 196). Eine Verwachsung von Plasma und Zellmembran soll für das Fehlen normaler Plasmolyse verantwortlich sein. Die bisher beobachtete Plasmolyse wird als letale Erscheinung gedeutet, und deshalb wird die Möglichkeit abgelehnt, mit Hilfe der Grenzplasmolyse den osmotischen Wert der Zelle zu bestimmen. Der Turgor der Cyanophyceenzelle soll weitgehend auf einem Quellungsmechanismus beruhen. Bei mit Eau de Javelle abgetöteten Zellen konnte mit Alkohol in den leer erscheinenden Zellen ein „unbegrenzt quellbarer Stoff“, die „Quellsubstanz“, festgestellt werden, der glykogenhaltig sein und sich vorwiegend im zentralen Teil der Zelle befinden soll. Das verschiedene Verhalten von benachbarten Zellen wird damit erklärt, daß alle Entwicklungsstadien, die bei den höheren Organismen auf die Embryonal-, Streckungs- und Dauerzone spezifisch beschränkt sind, hier beliebig verteilt in einem Faden vorkommen.

* Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät in Göttingen.

¹ Wo GEITLER von Chromatoplasma, Centroplasma und Endoplasten spricht, finden sich in der französischen Literatur nur zwei Begriffe: la couche corticale (Rindenzone) und le corps central (Zentralkörper) (GUILLIERMOND, 1906, 1926, 1933 DANGEARD, 1933 u. a.). Ein Begriff, der dem Centroplasma GEITLERS entspricht, fehlt.

Durch die nachstehenden Untersuchungen soll an einer größeren Anzahl von Arten versucht werden, die in der Literatur vorliegenden Widersprüche zu klären.

I. Experimenteller Teil.

A. Methodisches.

Die Algen stammen aus der Umgebung Göttingens, dem Taunus und aus afrikanischen Erdproben.

Chroococcales: Chroococcaceae: Aphanothece Naegelii Wartm.; *Entophysalidaceae: Chlorogloea microcystoides* Geitler. *Hormogonales: Oscillatoriaceae: Oscillatoria*¹ *animalis* Ag., *O. limosa* Ag., *O. brevis* (Kütz.) Gom., *O. sancta* (Kütz.) Gom., *O. pseudogeminata* G. Schmid, *O. Okeni* var. *gracilis*, *Lyngbya aeruginoso-coerulea* (Kütz.) Gom., *L. Martensiana* Menegh., *L. maior* Menegh., *Phormidium lividum* Näg., *Ph. viride* (Vauch.) Lemm., *Ph. papyraceum* Gom., *Ph. uncinatum* Gom.; *Nostocaceae: Nostoc calcicola* Bréb., *N. microscopicum* Carm., *Anabaena variabilis* Kütz., *A. cylindrica* Lemm., *Cylindrospermum maius* Kütz., *C. alatosporum* F. E. Fritsch; *Scytonemataceae: Scytonema Hofmannii*, var. *symplocoides* (Reinsch) Born. et Thur.², *Tolypothrix tenuis* Kütz., *T. distorta* Kütz.; *Stigonemataceae: Fischerella thermalis* (Schwabe) Gom.; *Rivulariaceae: Gloeotrichia Pisum* Thuret, *Calothrix marchica* Lemm.

Die Algen wurden möglichst artrein zum Teil auf Agar-Platten mit KNOPScher Nährlösung (GETTLER, 1932), meistens aber in Erdabkochung ($\frac{1}{3}$ Erde, $\frac{2}{3}$ Wasser 4 Std im Dampftopf gekocht, abgeschäumt und 3mal sterilisiert), auf Ballen von gereinigter Glaswolle gezogen; die Lösung wurde im Sommer leicht verdünnt, im Winter direkt verwendet.

Als Farbstoffe wurden verwendet: Methylenblau X, Neutralrot Y, Pyronin B, Methylgrün B³, Rosanilin B, Victoriablau B, Acridinorange B, Acridin B, Auramin R, Trypaflavin H, Na-Fluorescein R, Primulin B. (Herkunft: B = Bayer, H = Höchst, R = Riedel, X = stand. Präparat Behringwerke Nr. 335169, Y = stand. Präparat Behringwerke Nr. 333790). Konzentrationen der Diachrome: 1:100; 1:1000; der Fluorochrome 1:10000 (STRUGGER, 1949) und höher. Einstellen und puffern der Farblösung mit Phosphaten (STRUGGER, 1949). Der pH-Wert wurde mit der Chinhydronelektrode, im alkalischen Bereich mit Bayer-Indicatorpapier bestimmt.

Cytochemische Tests: Desoxyribonucleinsäure wurde mit Hilfe der FEULGEN-Methode und der Methylgrünessigsäurefärbung bestimmt, Ribonucleinsäure mit der Pyroninfärbung. Zum Glykogennachweis diente Jod-Jodkalium, außerdem wurde die BAUER-FEULGEN-Methode und der Nachweis nach GOMORI verwandt (s. GLICK, 1949). Fixiert wurde mit 96%igem Alkohol, sofern nicht anders verlangt (Glykogen-Nachweis). Hydrolysiert wurde mit 1 n HCl und 20%iger Trichloressigsäure. Zur Fällung der Nucleoproteide diente $\frac{1}{25}$ mol $\text{La}(\text{NO}_3)_3$.

¹ Trotz aller Sorgfalt ließ sich bei den Oscillatorien eine gewisse Unsicherheit der Benennung der Arten nicht immer vermeiden.

² Die Art wurde mir dankenswerterweise von Herrn Prof. STEINECKE überlassen.

³ Aus der 1%igen Farbstofflösung wurde das verunreinigende Methylviolett mit Chloroform ausgeschüttelt. Auf 100 cm³ Farblösung kommen 0,75 cm³ Eisessig.

B. Ergebnisse.

1. Die Zentralsubstanz.

Zu den nachstehend angewandten Färbungen ist vor auszuschicken, daß durch Diachrome, die meist verhältnismäßig konzentriert verwendet werden müssen, leicht letale Erscheinungen bewirkt werden können. Das gilt weniger von Fluorochromen, die erfahrungsgemäß in schwächeren Konzentrationen benutzt werden können (STRUGGER, 1949, BOGEN, 1953). Bei den Fluorochromen ist der Farbstoff bekanntlich in der lebenden Zelle zunächst nur im Fluoreszenzmikroskop nachweisbar; das Hellfeldbild ist unverändert. Dies hat den sehr großen Vorteil, an ein und demselben Objekt bei ständigem Wechsel der Optik und Vergleich beider Bilder die Färberegebnisse genau beurteilen zu können.

Mit Methylenblau (Hellfeld) und Acridinorange (Fluoreszenzbild) färbten sich in allen Fällen eindeutig genau die gleichen Zellstrukturen, wobei das Acridinorange trotz größerer Verdünnung das exaktere, farbenkräftigere Bild lieferte. Gefärbt wurden genau die Zellbestandteile, die in der Literatur als Zentralkörper oder Zentralsubstanz bezeichnet werden. Nachstehend wird immer der Ausdruck „Zentralsubstanz“ benutzt, weil er am wenigsten durch Interpretation vorbelastet ist.

Vor Anwendung von fluoreszierenden Farbstoffen mußte zunächst geprüft werden, wie sich die ungefärbte Cyanophyceenzelle im Fluoreszenzlicht verhält. Bei *Oscillatorien* zeigte sich nureine matt bordeauxrote Chlorophyllfluoreszenz, die im Zentrum deutlich schwächer war als an der Peripherie. Ob das Zentrum schwächer pigmentiert ist oder ob nur das darüber- bzw. darunterliegende Plasma allein fluoresziert, war bei der Kleinheit der Objekte normalerweise nicht zu entscheiden.

Zur Fluorochromierung wurde mit Acridinorange (STRUGGER, 1949) 1:10000 im Überschuß gefärbt; Färbezeit 10–20 min, bei großen Schleimmassen länger. Im sauren Bereich fluoreszierte die Membran kupferrot. Da dieser die sonstige Färbung beeinträchtigende Effekt um pH 5 abnahm und bei pH 7 verschwunden war, wurde im neutralen Bereich gefärbt, nur bei *Chroococalen* bei pH 8, weil hier die Membran bis zu pH 7 fluoreszierte.

Zur Fluorochromierung wurde mit Acridinorange (STRUGGER, 1949) 1:10000 im Überschuß gefärbt; Färbezeit 10–20 min, bei großen Schleimmassen länger. Im sauren Bereich fluoreszierte die Membran kupferrot. Da dieser die sonstige Färbung beeinträchtigende Effekt um pH 5 abnahm und bei pH 7 verschwunden war, wurde im neutralen Bereich gefärbt, nur bei *Chroococalen* bei pH 8, weil hier die Membran bis zu pH 7 fluoreszierte.

Abb. 1 gibt das Färbeergebnis an *Oscillatoria Okeni* var. *gracilis* wieder; die im Hellfeldbild (H) schwach gefärbten bis farblosen Bereiche (Z) zeigten im Fluoreszenzbild (F) intensive, wenn auch nicht völlig gleichmäßig gelb-grüne Farbe (ZS). Der fluoreszierende Bereich, die Zentralsubstanz¹, hob sich eindeutig vom übrigen Zellumen ab. Die Chlorophyllfluoreszenz war wegen der stärkeren Lichtintensität der Fluoreszenzfärbung nicht mehr wahrnehmbar. In gleicher Weise — Acridin-

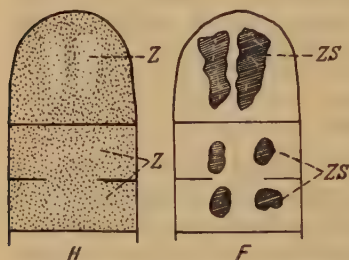


Abb. 1. *Oscillatoria Okeni*, var. *gracilis*. Acridinorangegefärbt. 1:10000. Hellfeldbild (H) und Fluoreszenzbild (F). Die schwächer gefärbten zentralen Bereiche (Z) des Hellfeldes sind mit der Zentralsubst. (ZS) im Fluoreszenzbild identisch.

¹ Sie kann bei *Oscillatoria Okeni* var. *gracilis* auch wesentlich anders geformt sein.

orangefärbung mit laufender Hellfeldkontrolle — wurde bei allen 27 Arten Vorkommen und Form der Zentralsubstanz untersucht. Es zeigte sich, daß jede normale Blaualgazelle eine Zentralsubstanz besitzt. Diese kann aber, was vorweggenommen sei, beträchtlich variieren und ist in ihrer Ausbildung für die einzelnen systematischen Gruppen charakteristisch.

Form der Zentralsubstanz bei einzelnen systematischen Gruppen.

In *Oscillatorien*-Zellen (Abb. 2) hatte die Zentralsubstanz meist eine geschlossene, etwa der Zellform entsprechende Gestalt (Abb. 2a, d, f), seltener war sie stark ausgebuchtet bis wabig (Abb. 2e), kugelig (Abb. 2c) oder in mehrere Partikel aufgelöst (Abb. 2b); der Teilungszustand hatte x-Form. Die hellen bis farblosen Bezirke des Hellfeldes entsprachen genau den gelb-grün fluoreszierenden Stellen.

Die von KOHL (1891) u. a. beschriebenen „Plasmodesmen“ erscheinen so als Spätstadien der Zellteilung, denn nach beendigter Zellteilung fand ich, daß die Quermembran völlig geschlossen aussah.

In der Längsrichtung der Zelle war die Zentralsubstanz relativ glatt begrenzt, zu den Quermembranen hin, wo das Plasma deutlich schmaler war, sah man vereinzelt feine Fortsätze.

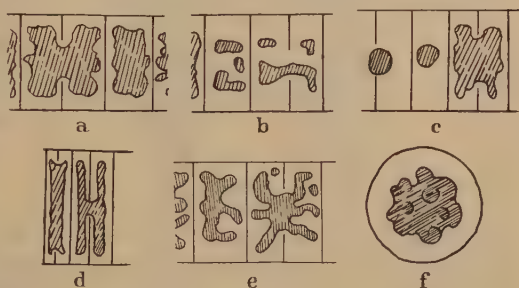


Abb. 2. Verschiedene Formen der Zentralsubstanz im Fluoreszenzmikroskop nach Färbung mit Acridinorange 1:10000. a *Phormidium viride*, b *Phormidium papyraceum*, c *Phormidium uncinatum*, d *Oscillatoria limosa*, e *Oscillatoria brevis*, f *Oscillatoria limosa*, Queransicht.

Bei Chroococcalen stell-

te die Zentralsubstanz immer eine zusammenhängende Masse dar, die der Zellform entsprach. Im Teilungszustand war sie in der Mitte eingeschnürt. Gegen das Chromatoplasma war sie nicht scharf begrenzt.

Bei den *Rivulariaceen* unterscheiden sich die jungen Hormogonien kaum von *Oscillatorien* (Abb. 3a); alle Zellen sind teilungsfähig. Bald aber wird die endständige Heterocyste erkennbar, und bei älteren Trichomen beschränkt sich dann die Zellteilung auf eine „meristematische Zone“ (DE BARY, 1863, SCHWEN-DENER, 1894) (Abb. 3b). Aus deren Zellen entwickeln sich in polarem Gegensatz einerseits die mit körniger Substanz gefüllten Dauerzellen, andererseits die vacuolierten Spitzenzellen. Im Endzustand (Abb. 3c) ist keine meristematische Zone mehr zu erkennen.

Die Zentralsubstanz entsprach bei jungen *Rivulariaceen*-Trichomen und in der meristematischen Zone älterer Fäden dem *Oscillatorien*-typ (Abb. 4a). In der Dauerzelle (Abb. 4b D) und in den ihr benachbarten Zellen lag sie hingegen weitgehend in Grana vor (Abb. 4b, 5a ZSg). Diese Grana deckten sich aber nicht mit der im Hellfeld erkennbaren Körnelung, den Cyanophycinkörnern (Abb. 4b Cy). In der Heterocyste (He) bildete die Zentralsubstanz eine zusammenhängende Masse

(Abb. 4a F und 4b F), und in den Spitzenzellen war sie annähernd hantelförmig (Abb. 5b) oder weitgehend reduziert (s. S. 182).

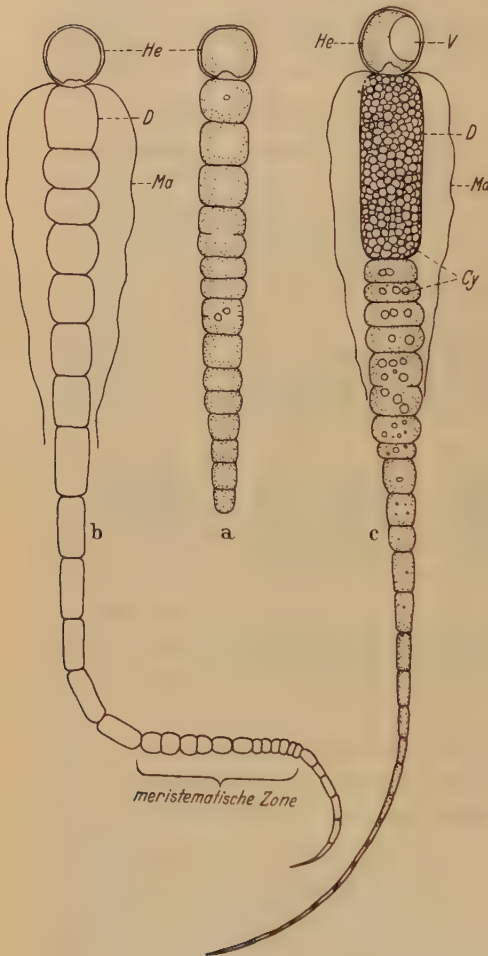


Abb. 3. *Gloeotrichia Pism.* a junges Trichom, nur die Heterocyste (He) ist bereits von den übrigen vegetativen Zellen zu unterscheiden. b älteres Trichom, um die sich gerade bildende Dauerzelle (D) hat sich eine Schleimscheide, das Manubrium (Ma) gebildet. Die Teilungsfähigkeit ist auf eine meristematische Zone beschränkt. c altes Trichom, in dem keine Zellteilung mehr stattfindet; die Heterocyste enthält eine Vacuole (V), die Dauerzelle u. d. Nachbarzellen enthalten Cyanophycinkörner (Cy).

Bei *Nostocaceen* zeigte die Zentralsubstanz bei Zwischenstufen von vegetativen Zellen zu Dauerzellen alle oben beschriebenen Formen und deren Übergänge bis zur Aufteilung in Grana (Abb. 6).

Fischerella thermalis (*Stigonemataceae*) besitzt als verzweigte Form (stellenweise zweireihig) Hauptfäden aus rundlichen, „torulösen“ Zellen mit dicken Membranen und Scheiden, Seitentrichome aus rechteckigen Zellen und oscillatorien-ähnliche Hormogonien. In den Zellen der Hauptfäden und den anschließenden der Seitenfäden sind Vacuolen häufig.

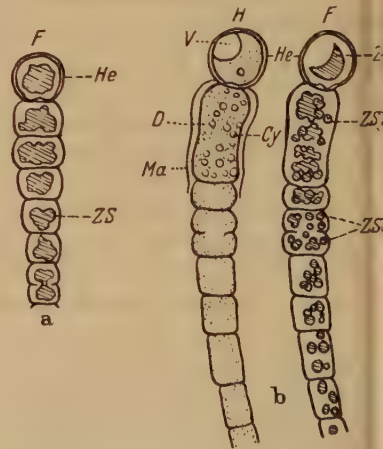


Abb. 4. *Gloeotrichia Pism.* Acridinorangegefärbung 1:10 000. Hellfeld- (H) und Fluoreszenzbild (F). a junges Trichom mit teilungsfähigen Zellen; Zentralsubstanz (ZS) als geschlossener Körper. b älteres Trichom, Zellen nicht mehr teilungsfähig. Zentralsubstanz (ZS) in Form von Grana (ZSg); He Heterocyste, V Vacuole, D Dauerzelle, Ma Manubrium, Cy Cyanophycinkorn.

Die Zentralsubstanz der Hormogonien (Abb. 7c) und der Spitzen der Seitentrichome (Abb. 7b) von *Fischerella thermalis* entsprach dem Oscillatorientyp. In älteren Seitentrichomen bildete die Zentralsubstanz mehrere unregelmäßige, von

zahlreichen Grana umgebene Partikel (Abb. 7a). In den vacuolisierten, torulösen Zellen gab es nur noch Zentralsubstanzgrana, die jedoch auch hier nicht mit den Cyanophycinkörnern des Hellfeldes identisch waren.

Bei *Scytonema Hofmanni* (Abb. 8) zeigten die wachsenden Trichomspitzen kompakte Zentralsubstanz, die alten Zellen zahlreiche Grana.

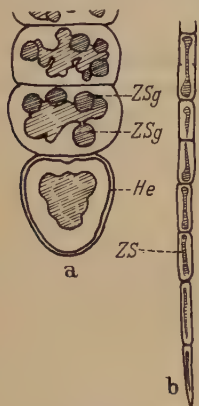


Abb. 5.

Abb. 5. *Calothrix marchica*. Acridinorangefärbung 1:10000. Fluoreszenzbild. a basaler Teil eines älteren Trichoms, deutliche Aufteilung der Zentralsubstanz in Grana. b Spitzenzellen mit ± hantelförmiger Zentralsubstanz.

Abb. 6. *Anabaena variabilis*. Acridinorangefärbung 1:10000. Fluoreszenzbild. Umwandlung der kompakten Zentralsubstanz in einzelne Grana (ZSg) beim Übergang von der vegetativen Zelle zur Dauerzelle (D).

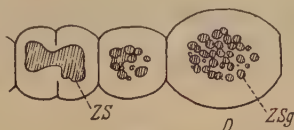


Abb. 6.

Aus der Gesamtheit der Untersuchungen an allen 27 Arten ergab sich übereinstimmend, daß die Form der Zentralsubstanz bei den höher differenzierten Cyanophyceen vom Alter der Zellen abhängt. Abb. 9 gibt schematisch die Verteilung des Aussehens der Zentralsubstanz in den

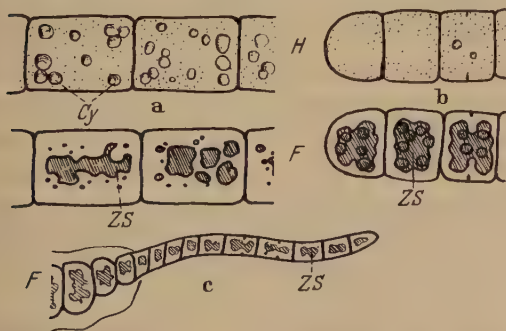


Abb. 7.



Abb. 8.

Abb. 7. *Fischerella thermalis*. Acridinorangefärbung 1:10000. Hellfeld- (H) und Fluoreszenzbild (F). a älteres Seitentrichom, Zentralsubstanz (ZS) in viele verschieden große Partikelchen aufgeteilt. b Seitentrichomspitze, Zentralsubstanz noch als geschlossener Körper, und c Hormogonium und Cy Cyanophycinkörner.

Abb. 8. *Scytonema Hofmanni*. Acridinorangefärbung 1:10000. Fluoreszenzbild. a Junge Trichomspitze mit fast einheitlicher Zentralsubstanz. b Alte Zellen mit in Grana zerfallener Zentralsubstanz.

verschiedenen Regionen eines Fadens wieder. Im Bereich ständiger Zellteilung, bei den Hormogonien, den weiterwachsenden Trichomenden und in der meristematischen Zone bildet sie einen zusammenhängenden

Komplex. Mit zunehmendem Alter gliedert sie sich mehr und mehr auf, bis sie völlig in Grana zerteilt ist.

Die gelb-grüne Fluoreszenz der Zentralsubstanz ging nach einiger Zeit in eine kupferrote Farbe über. Die STRUGGERSche Deutung dieser Umfärbung als Konzentrationseffekt ist heute umstritten; bereits HÖFLER, TOTH und LUHAN (1949) nehmen verschiedene Bindungsarten des Farbstoffes an, und BOGEN (1953) wendet sich nachdrücklich gegen STRUGGERS Auffassungen. Bei *Oscillatorien* färben sich Einzelzellen bis ganze Fäden in dieser Weise um, bei *Fischerella thermalis* beginnt die Veränderung immer mit den Hormogonien. Bei *Scytonemataceen* verfärben sich zuerst die Trichomspitzen. In all diesen Fällen wurden auch die Randteile der Zellen, das Chromatoplasma, rotstichig; doch waren auch nach diesem Farbumschlag Zentralsubstanz und Chromatoplasma stets mühelos durch die unterschiedliche Farbintensität zu unterscheiden.



Abb. 9. Schematische Darstellung des Vorkommens und der Form der Zentralsubstanz in einer fadenförmigen Cyanophyceen.

Bei Färbung in stark alkalischem Bereich zeigten sich öfters in Zellen mit gelbgrün fluoreszierender Zentralsubstanz rote Partikelchen. Ihre Natur konnte nicht ermittelt werden; auch genaueste Vergleiche mit dem Hellfeld hatten keine Ergebnisse. Diese Beobachtung konnte nur an *Nostocaceen* und verzweigten Formen gemacht werden. Cyanophycinkörner blieben bei Acridinorangefärbung in der Regel ungefärbt. Die Nekriden (Konkavzellen), d. h. abgestorbene Zellen, fluoreszierten homogen, zuerst gelbrot, später kupferrot und zeigten keine Innenstrukturen.

2. Die Vacuolenbildung bei Cyanophyceen.

Daß den Blaualgen im allgemeinen die Vacuole fehlt, wertet GEITLER (1922 ff.) als ein charakteristisches Merkmal. Wo gelegentlich doch Vacuolen auftreten (z. B. in Haarzellen der *Rivulariaceen*), gilt das als Degenerationszeichen (GEITLER, 1936) oder soll mit dem extremen Längenzunehmen dieser Zellen zusammenhängen (KÜSTER, 1935). Trotzdem enthält die Literatur zahlreiche Mitteilungen über Vacuolen bei Cyanophyceen.

Am häufigsten wurden Vacuolen im Anschluß an Neutralrotfärbung beobachtet, woraus man schloß, daß sie erst durch die Färbung entstehen (GUILLIERMOND, 1926, 1933, BECKER und BECKEROWA, 1937, SCHÖNLEBER, 1937, DUGHI, 1946 ff., u. a.). ZACHARIAS (1890) beobachtete ihre Bildung bei Dunkelkulturen. Seltener sind Angaben über normalerweise vorgefundene Vacuolen: PRAT (1925) fand sie in alten Zellen von *Tolypothrix*, SCHÖNLEBER (1937) große in den Spitzenzellen von *Scytonema javanicum*. Solche Beobachtungen gelten aber als Ausnahmen, die durch Außenfaktoren bedingt sind. DUGHI (1949) spricht sogar von Pseudovacuaolen, die den Vacuolen aller höher stehenden Pflanzen nicht homolog sein sollen. Dafür spräche besonders, daß diese Vacuolen keinen Niederschlag enthielten. Auch DRAWERT spricht ganz allgemein vom „Nichtvorhandensein von Zellsaftvacuolen“ und

einer „ganz allgemein hohe(n) Viscosität des Cyanophyceanprotoplasten“; denn „nie wurde in irgendeinem Teil der lebenden Blaualgenzelle BROWNSche Molekularbewegung, nie Plasmaströmung beobachtet“ (1949, S. 166). Fehlende Plasmaströmung — als Zeichen hoher Viscosität — konnte ich an meinen Algen bestätigen. Daß eine zufällig eingerissene Zelle von *Fischerella thermalis* nicht auslief, sondern einen starren, festen Plasmainhalt zeigte, liegt m. E. auch wohl mehr an dieser hohen Plasmaviscosität, als an der Folge des Wundreizes.

Zu untersuchen war 1. ob es Cyanophyceen gibt, bei denen Vacuolen stets im Lauf der normalen Entwicklung vorkommen, und 2. ob und unter welchen Bedingungen solche Cyanophyceen, die normalerweise keine Vacuolen besitzen, vielleicht doch unter besonderen Verhältnissen solche bilden können, und ob das experimentell zu erreichen ist.

a) Vorkommen von Vacuolen im normalen Entwicklungsgang.

Es zeigte sich bald, daß gewisse Cyanophyceen stets Vacuolen besitzen. Am größten waren sie in den torulösen, also alten Zellen der Hauptfäden von *Fischerella thermalis* (Abb. 10), teilweise auch im basalen Abschnitt der Seitenfäden. In allen Jahreszeiten hatten die Fäden normale grüne Färbung und ständig Vacuolen, in denen häufig heftige BROWNSche Molekularbewegung ein bis mehrerer Partikelchen aufwiegen (Abb. 10a H). Nach Färbung mit Acridinorange (im basischen Bereich) fluorescierten die Vacuolen von *Fischerella thermalis* kupferrot. Die gelb-grün leuchtende Zentralsubstanz lag in Form von Grana vor (Abb. 10 F), die je nach Lage der Vacuole dieselbe ganz umgaben oder ihr halbmondförmig angelagert waren. Gegenüber jungen, unvacuolisierten Zellen machte die Zentralsubstanz in solchen alten Zellen einen nur ge-

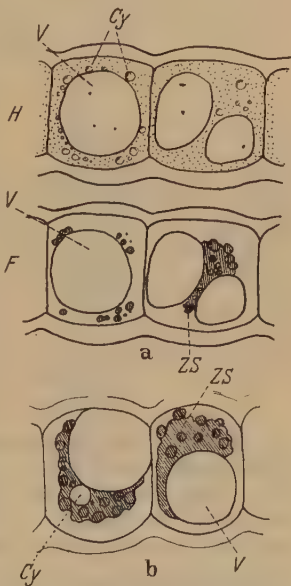


Abb. 10. *Fischerella thermalis*. Acridinorangegefärbung 1:10 000. a Hellfeld- (H) und Fluoreszenzbild (F). In alten Zellen mit Vacuolen (V) liegt die Zentralsubstanz (ZS) — meist in Form von Grana — um dieselben herum; die Cyanophycinkörner (Cy) sind mit diesen Grana nicht zu identifizieren; im Hellfeld waren in den Vacuolen Partikelchen zu erkennen, die BROWNSche Molekularbewegung vollführen. b Fluoreszenzbild mit Cyanophycinkorn (Cy).

ringen Teil des Zellvolumens aus; in jüngeren Zellen mit Vacuolen bildete sie noch einen zusammenhängenden Komplex, der sich erst in Grana aufzuteilen begann (Abb. 10b). Die Cyanophycinkörner blieben nach Acridinorangebehandlung ungefärbt und zeichneten sich als dunkle Flecken von der Zentralsubstanz ab (in der Abbildung hell auf dunklem Grund).

Die *Rivulariaceae Gloeotrichia Pisum* (Abb. 11) zeigte in den Haarzellen viele kleine Vacuolen, durch die der Protoplast ein netzförmiges Aussehen

bekam, oder einen großen zentralen Zellsaftraum. Die Zellsaftblasen waren hier nicht rundlich, sondern ausgesprochen eckig; das Plasma ragte zuweilen kantig in sie hinein.

Die gelb-grün fluoreszierende Zentralsubstanz war in diesen Zellen in viele kleine Partikelchen aufgeteilt (Abb. 11a F), oder sie lag in langgestreckter Form

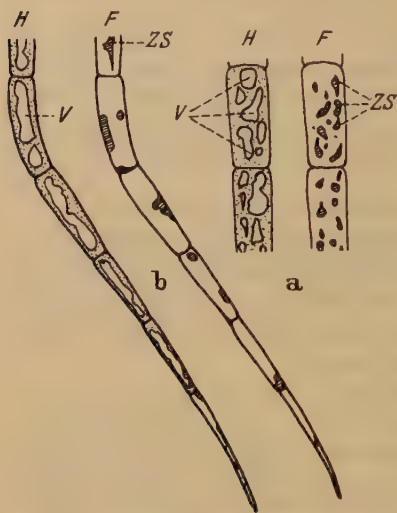
im randständigen Plasma (Abb. 11b F). Sie war jeweils nur bei einer bestimmten optischen Einstellung sichtbar und schien hier demnach reduziert zu sein.

Bei *Fischerella thermalis* wie *Gloeotrichia Pisum* traten Vacuolen offensichtlich erst in einem gewissen Altersstadium auf. Die vacuolisierten Zellen zeigten nie Teilungsstadien und lagen außerhalb der Wachstumszone.

Kamen bei *Fischerella thermalis* in älteren Trichomteilen trotzdem Zellteilungen vor — wodurch die Fäden stellenweise zweireihig wurden —, so handelte es sich dabei stets um unvacuolisierte Zellen mit kompakter Zentralsubstanz ohne beginnende Granulation.

Es gibt also Cyanophyceen, die in bestimmten Zellen immer Vacuolen bilden; wie die gleichzeitig zu beobachtende schrittweise Aufteilung der Zentral-

Abb. 11. *Gloeotrichia Pisum*. Acridinorange-färbung 1:10000. Hellfeld- (H) und Fluoreszenzbild (F). Zentralsubstanzformen (ZS) in Haarzellen. a mit vielen kleinen Vacuolen (V), b mit großen Vacuolen.



substanz in Grana muß auch die Vacuolenbildung als Alterserscheinung aufgefaßt werden.

b) Experimentelle Erzeugung von Vacuolen.

Im August, dem Höhepunkt der Entwicklung von *Gloeotrichia Pisum*, wurden Proben gesammelt und an ein Nordfenster gestellt. Hier begannen die kugeligen Gallert-Kolonien innerhalb von 2—3 Wochen weich und leicht zerquetschbar zu werden, um anschließend zu zerfallen. Innerhalb desselben Zeitabschnittes war am natürlichen Standort nichts dergleichen zu beobachten.

Die unausgewachsenen, zerfallenden Kolonien enthielten Trichome, die wenig differenziert waren (Dauerzellbildung beginnend, haarförmige Spitzenzellen fehlend). Trotz dieses Jugendstadiums hatten die Zellen zum Teil Vacuolen; Teilungsstadien fehlten wieder völlig. Bei den jüngsten Trichomen hatten alle Zellen Vacuolen (Abb. 12a). Je weiter sich die der Heterocyste benachbarten Zellen in Richtung auf die Dauerzellenform umgebildet hatten — kenntlich an der Vermehrung und Größe der Cyanophycinkörner sowie an der Granulierung der Zentral-

substanz —, desto häufiger waren die Zellen dieses Bereiches ohne Vacuolen (Abb. 12b). Fast ausgewachsene Dauerzellen waren in vielen Fällen die einzigen vacuolenfreien Zellen eines Trichoms (Abb. 13a). Die Zen-

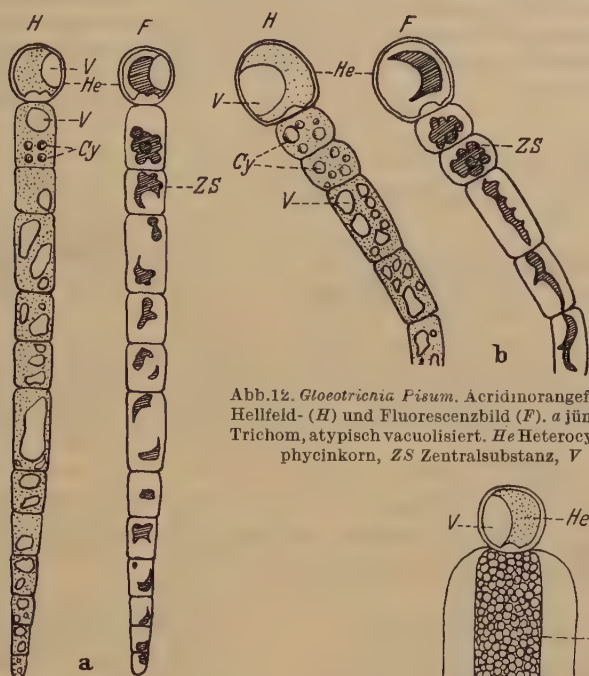


Abb. 12. *Gloeotrichia Pism*, Acridinorangefärbg. 1:10000. Hellfeld- (H) und Fluoreszenzbild (F). a) jüngeres, b) älteres Trichom, atypisch vacuolisiert. He Heterocyste, Cy Cyanophyceinkorn, ZS Zentralsubstanz, V Vacuole.

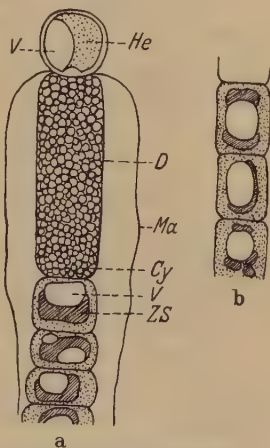


Abb. 13. *Gloeotrichia Pism*, Acridinorangefärbg. 1:10000. In den vegetativen Zellen ist das Fluoreszenzbild in das Hellfeldbild eingezeichnet. a) Fast reifes, atypisch vacuolisiertes Trichom. b) Vacuolisierte Zellen. He Heterocyste, Ma Manubrium, ZS Zentralsubstanz, Cy Cyanophyceinkörner, D Dauerzelle, V Vacuole.

tralsubstanz lag der Vacuole mützenförmig an, oder die Vacuole war beiderseits oder ringförmig von Zentralsubstanzpartikelchen umgeben (Abb. 13b). Zumindest bei diesen Zellen muß die Vacuole also im Zellzentrum entstanden sein.

Da Hellfeld- und Fluoreszenzbild zusammen erst ein anschauliches Bild über die Lage der einzelnen Zellbestandteile ermöglichen, sind in Abb. 13 diese beiden Bilder zu einem Einheitsbild vereinigt. Bei Färbung im alkalischen Bereich sind Vacuole und Zentralsubstanz gleichzeitig gefärbt, so daß eine genaue Orientierung möglich ist.

Während *Gloeotrichia Pism* schon normalerweise Vacuolen ausbildet — wenn auch nicht immer im zuletzt beschriebenen Ausmaß — treten sie bei *Nostocaceen* niemals im natürlichen Entwicklungsverlauf auf. Zu meiner Überraschung fand ich aber in überalterten Erdekoktkulturen von *Cylindrospermum alatosporum* und *C. maius* sowie *Anabaena cylindrica* und *A. variabilis* zahlreiche

Zellen mit Vacuolen (Abb. 14, 15¹ und 16). Die Vacuolen waren teils groß und zentral (Abb. 14) oder mehr randständig (rechte und linke Zelle in Abb. 16), teils zahlreich und klein, so daß der Protoplast mehr netzförmig aussah (Abb. 16, mittlere Zelle). BROWNSche Molekularbewegung wurde deutlich in Vacuolen von *Anabaena variabilis* und *Cylindrospermum alatosporum* (vgl. Abb. 16) beobachtet. Die Form der Zentralsubstanz variierte von halbmondförmigen Scheibchen bis zu einzelnen, unregelmäßigen Partikeln, die — wie bei *Gloeotrichia* — die Vacuole rings umgaben (Abb. 14).

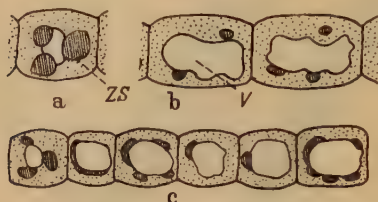


Abb. 14. *Cylindrospermum maius* aus überalterten Erdkoktkulturen. Acridinorange-färbg. 1:10000. Mit Zeichenapparat wiedergegebenes Fluoreszenzbild.
ZS Zentralsubstanz, V Vacuole.



Abb. 15. *Cylindrospermum maius*. Acridinorange-färbung 1:10000. Mit Zeichenapparat gezeichnet, normale vegetative Zellen im Fluoreszenzmikroskop zum Vergleich mit Abb. 14. ZS Zentralsubstanz.

Im allgemeinen war der Gehalt an Zentralsubstanz um so geringer, je größer die Vacuole war; einzelne stark vacuolisierte Zellen von *Anabaena variabilis* schienen auf Grund des färberischen Verhaltens sogar völlig frei davon zu sein (Abb. 17).

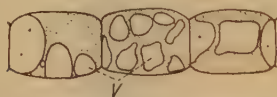


Abb. 16. *Cylindrospermum alatosporum* aus überalterten Erdkoktkulturen. Zellen mit zahlreichen verschieden gestalteten Vacuolen (V), in denen kleine Partikelchen BROWNSche Molekularbewegung vollführten. Hellfeld.

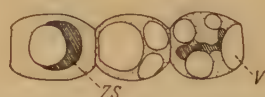


Abb. 17. *Anabaena variabilis* aus überalterter Erdkoktkultur. Acridinorange-färbung. Mittlere Zelle frei von Zentralsubstanz (ZS).

Auch bei überalterten Kulturen von *Scytonema Hofmanni* traten Vacuolen in einzelnen Trichomenden auf; die Form der Zentralsubstanz entsprach der in Abb. 13a.

Alle Zellen mit Vacuolen und ohne oder mit fast keiner Zentralsubstanz besaßen nur einheitliches, grünes Protoplasma, das in nicht angefärbten Zellen sowohl am Rande als auch in Plasmasträngen, die sich durch das Zellinnere zogen, reine, homogene Chlorophyllfluoreszenz zeigte. Demnach sind die Vacuolen, die sich hier als schwarze Flecken abzeichneten, nur von Chromatoplasma umgeben, wie es auch DRAWERT (1949) bei *Oscillatoria Borneti* festgestellt hat.

¹ Abb. 14 und 15 sind mit dem Zeichenapparat ausgeführt. Diese Abbildungsmethode stößt bei Ölimmersion wegen der geringen Lichtstärke auf Schwierigkeiten, sie wurde deshalb nur selten angewandt.

Wie schon erwähnt, berichten verschiedene Autoren vom Auftreten stets kleiner Vacuolen nach Neutralrotfärbung. Unter dem Einfluß von Neutralrot sowie Acridinorange traten bei einigen Versuchen in *Gloeotrichia Pisum* kleine Vacuolen in vorher unvacuolisierten Zellen auf, allerdings direkt benachbart zu bereits vacuolisierten Zellen. Ebenso verhielten sich Zellen von *Fischerella thermalis*, *Anabaena variabilis*, *Cylindrospermum maius* und *C. alatosporum* aus den erwähnten, überalterten Erdkoktkulturen. Zunehmende Färbezeit erhöhte etwas die Zahl der neu entstehenden Vacuolen. Wo die Zellen bereits kleine Vacuolen besaßen, wurden sie teilweise durch den Farbstoff vergrößert. Bei voll vitalen Algen erzeugten die Vitalfarbstoffe aber keine Vacuolen.

Nach SCHÖNLEBER (1936) bildet *Scytonema Julianum* sowohl in BEYERINGScher Nährlösung als auch in aqua dest. innerhalb von 4 Wochen Vacuolen. Um dies nachzuprüfen, wurden Proben von voll vitalen Kulturen von *Anabaena variabilis*, *Cylindrospermum maius*, *Scytonema Hofmanni*, *Tolypothrix distorta*, *Lyngbya maior* und *Oscillatoria limosa* in aq. dest. gespült, in ERLÉNMEYER-Kolben aus Jenaer „Gerätéglass 20“ gefüllt und an ein Nordfenster gestellt. Als Kulturmedium diente über Quarz destilliertes Wasser ohne irgendwelchen Salzzusatz. Nach 4 Wochen waren noch keine Vacuolen zu entdecken; 3 Monate später war aber die ursprünglich feste Gallerte dünnflüssig geworden, die einzelnen Zellen in den Trichomen waren verschieden stark aufgequollen und enthielten zum großen Teil Vacuolen.

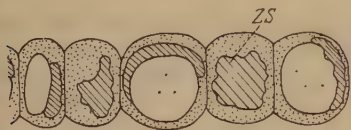


Abb. 18. *Anabaena variabilis*. Vacuolisierte Zellen aus aqua dest.-Kultur. Acridinorange-färbung 1:10000. Hellfeld mit eingezeichnetem Fluoreszenzbild. Die Zentralsubstanz (ZS) ist in einzelnen Zellen stark gequollen, durch lockere Schraffierung angedeutet.

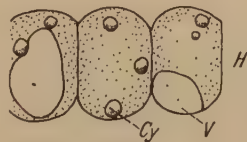


Abb. 19. *Anabaena variabilis* aus aqua dest.-Kultur. Acridinorange-färbung 1:10000. Hellfeld- (H) und Fluoreszenzbild (F). Die im Hellfeld zu erkennenden Cyanophycinkörner (Cy) sind ausnahmsweise auch mit Acridinorange gefärbt. ZS Zentralsubstanz. V Vacuole.

Bei *Anabaena variabilis* besaß die überwiegende Mehrzahl der Zellen Vacuolen, die bis zu $\frac{2}{3}$ des Zellumens ausfüllten (Abb. 18) und häufig BROWNSche Molekularbewegung zeigten. Die Zentralsubstanz bildete eine zusammenhängende Masse, die trotz ausreichender Färbezeit nur matt fluorescierte und besonders in den wenigen noch nicht vacuolisierten Zellen einen stark gedunsenen Eindruck machte. Ihre Verteilung in der Zelle entsprach dem gewohnten Bild (Abb. 18). In einzelnen Zellen konnten gefärbte Grana festgestellt werden, die sich im Vergleich mit dem Hellfeld als Cyanophycinkörner erwiesen (Abb. 19).

Bei *Cylindrospermum maius* (das jedoch empfindlicher ist und leicht abstirbt) sowie bei *Scytonema Hofmanni* und *Tolypothrix distorta* entstanden ebenfalls bei diesen Versuchen Vacuolen. *Oscillatoria limosa* bildete hingegen selbst nach 5 Monaten keine; dagegen zeigte eine kleine *Oscillatoria*, die eine *Anabaena variabilis*-Kultur verunreinigte, in vielen Zellen deutlich Zellsafträume.

Versuche mit durch H_2SO_4 bzw. $NaOH$ stark sauer bzw. alkalisch gemachten Lösungen (Erddekot, KNORSche Nährlösung und Mangellösungen nach RUGE, 1951) an *Anabaena variabilis* ließen keine Tendenz zur Vacuolenbildung erkennen, wohl aber ein Zunehmen der Cyanophycinkörner im extrem sauren wie alkalischen Bereich.

Die vacuolisierte *Anabaena variabilis* aus den überalterten Erddekotkulturen (Abb. 20) besaß Zellen, deren Verständnis zunächst Schwierigkeiten machte. Im Hellfeld konnte man einen hellen zentralen Bereich (Z) vom Chromatoplasma unterscheiden; zuerst vermutete ich, daß es sich um eine nicht ganz deutlich zu erkennende Vacu-

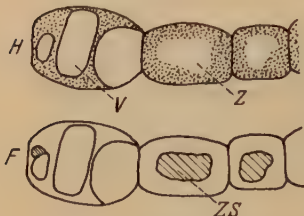


Abb. 20. *Anabaena variabilis* aus überalterter Erddekotkultur. Die zentralen farblosen Bereiche (Z) des Hellfeldes (H), die vacuolenähnlich aussehen, erwiesen sich als Übergangsstadien der Zentralsubstanz (ZS), die nur matt fluoresciert (weite Schraffur). V Vacuole.

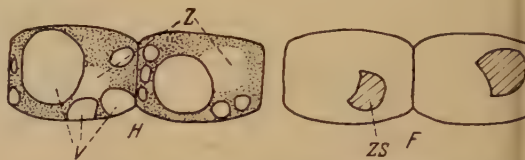


Abb. 21. *Anabaena variabilis*. Acridinorangegefärbung 1:10000. Hellfeld- (H) und Fluoreszenzbild (F). Vacuolisierte Zellen mit farblosem, zentralem Bereich (Z), der sich im Fluoreszenzbild als stark gequollene Zentralsubstanz zu erkennen gibt. Es handelt sich um ein „Übergangsstadium“.

ole handeln müsse (Abb. 20 H). Eigenartigerweise fluorescierte dieser Bereich aber nicht wie erwartet kupferrot, dem Farbton fluorochromierter Vacuolen, sondern gelbgrün, auch nicht intensiv wie die typische Zentralsubstanz, sondern gedämpft und homogen (Abb. 20 F). Auffällig war, daß solche gedämpft gelbgrün fluoreszierenden Partien entweder in unmittelbarer Nachbarschaft bereits

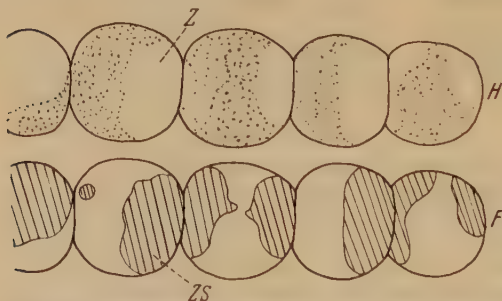


Abb. 22. *Anabaena variabilis* aus aqua dest.-Kultur. Acridinorangegefärbung 1:10000. Hellfeld- (H) und Fluoreszenzbild (F). Die farblosen Bereiche des Hellfeldes (Z) entsprechender stark gedunsenen Zentralsubstanz (ZS).

fluoreszierten diese Zellteile matt gelbgrün (Abb. 22 F). Entsprechende Befunde zeigten *Tolypothrix distorta* und — wie oben schon angedeutet — *Oscillatoria limosa* in aqua dest.-Kulturen.

Nach allem gewinnt man den Eindruck, daß die Vacuolen (zu deren Bildung verschiedene Cyanophyceen veranlaßt werden konnten) in

vacuolisierten Zellen lagen, oder in solchen selbst, wo sie der Vacuole als restliche Zentralsubstanz unmittelbar anlagen (Abb. 21). BROWNSche Molekularbewegung war in diesem Teil der Zelle in keinem Fall zu beobachten. Bei *Anabaena variabilis* aus aqua dest.-Kulturen gab es gleichfalls Zellen mit hellen, vacuolenähnlichen Flecken, die unscharf begrenzt waren. BROWNSche Molekularbewegung fehlte auch hier. Diese hellen Stellen sahen ganz anders aus als zweifelsfreie Vacuolen (Abb. 22 H). Wie im ersten Fall

ihrer Entstehung in Beziehung zur Zentralsubstanz ständen. Je weiter die Vacuolenbildung fortgeschritten war, desto geringer war die Menge der — der Vacuole übrigens immer irgendwie anliegenden — Zentralsubstanz in der Zelle. Vereinzelt war in den Zellen sogar überhaupt keine Zentralsubstanz mehr zu erkennen. In Zellen, die auf dem Wege zur Vacuolenbildung waren, schien die Zentralsubstanz auch in verändertem, dem Anschein nach gequollenen Zustand vorzuliegen, so daß der Eindruck erweckt wurde, daß es sich um den Übergang von der dichteren Zentralsubstanz zur flüssigen Vacuole handle. Es sieht so aus, als ob die Zentralsubstanz vom Gel- in den Solzustand überginge. Mit solchen Deutungen muß man bei der Kleinheit des Objekts aber natürlich vorsichtig und zurückhaltend sein; es kann sich bei dieser Interpretation um nicht mehr als — immerhin durch die Beobachtung gut fundierte — Vermutungen handeln.

c) Keritomie.

Das wabige Aussehen des Plasmas durch Zellsaftbildung, wie es z. B. von *Oscillatoria Borneti* bekannt ist, hat GEITLER (1932, 1936) Keritomie genannt. Keritomie soll nach GEITLER auf Oscillatorien beschränkt, reversibel und kein Degenerationsmerkmal sein. Die ersten Angaben von „keritomischer“ Veränderung finden sich schon bei ZUKAL (1894). DRAWERT vermutet, daß die Zellsafträume bei *Oscillatoria Borneti* mit einem Gel gefüllt seien.

Nach meinen Beobachtungen an *Phormidium* findet bei der keritomischen Vacuolisation Verminderung bis Verschwinden der Zentralsubstanz statt. Es scheint also kein grundsätzlicher Unterschied zwischen Vacuolisation und Keritomie zu bestehen.

d) Die Färbbarkeit der Vacuole.

Untersuchungen über die Färbbarkeit der Vacuole von Cyanophyceenzellen mit Neutralrot liegen von SCHÖNLEBER (1937) für *Scytonema javanicum* und von DRAWERT (1949) für *Oscillatoria Borneti* vor. Während SCHÖNLEBER im sauren Bereich eine Membran- und Scheidenfärbung und im alkalischen eine Vacuolenfärbung beobachtete, fand DRAWERT schon ab pH 3,5 vereinzelt schwache Vacuolenfärbung; von pH 4 bis pH 6,5 färbten sich die Vacuolen unterschiedlich intensiv, doch glich sich dies zum Alkalischen hin immer mehr wieder aus.

Bei meinen Versuchen mit Neutralrot an *Anabaena variabilis*, *Cylindrospermum maius* und *Fischerella thermalis* färbten sich sowohl die Vacuolen benachbarter Zellen als auch mehrere Vacuolen einer Zelle verschieden stark. Bei *Fischerella thermalis* begann eine eindeutige Vacuolenfärbung mit pH 6. Im sauren Bereich färbte sich außerdem das Plasma offenbar geschädigter Zellen, und bereits von pH 4 an vereinzelt auch die Zentralsubstanz. Im alkalischen Bereich waren hin und wieder Chromatoplasmafärbungen zu erkennen, die den von SCHÖNLEBER (1937) beschriebenen Rahmenfärbungen entsprechen.

Mit Acridinorange war eine Vacuolenfärbung bei *Fischerella thermalis* erst bei pH 8 zu beobachten. Die kleinen Partikelchen, an denen man die BROWNSche Molekularbewegung erkennen konnte, blieben in allen Fällen ungefärbt.

Während der mikroskopischen Beobachtung ließ bei *Fischerella thermalis*, *Gloetrichia Pisum*, *Anabaena variabilis* und *Cylindrospermum maius* die Färbung nach, bis die Vacuolen wieder farblos waren. Da die untersuchten Algen vom Ende der

Färbezeit an unausgesetzt in einer Pufferlösung mit gleichem p_H lagen, kommt ein verändertes Außen- p_H als Ursache für die Entfärbung wohl kaum in Frage.

Vacuolenfärbung ist also sowohl mit Neutralrot als auch mit Acridinorange zu erreichen.

e) Das Plasmolyseverhalten der Blaualgenzelle.

Es ist hinlänglich beschrieben worden, daß die typische Blaualgenzelle im allgemeinen keine normale Plasmolyse bildet. Statt dessen erscheint der Protoplast in plasmolisierend wirkenden Lösungen eingedellt und zerknittert, wobei er sich nur unvollständig von der Membran abhebt. Die Literatur spricht von Schrumpf-, Krampf- oder Konkavplasmolyse und nennt dafür verschiedene Gründe. KOHL (1903) und GEITLER (1936) u. a. nehmen an, daß der Zelle ein eigentlicher Zellsaft fehlt. Für eine erhöhte Plasmaviscosität spricht, daß keine BROWNSCHE Molekularbewegung noch Plasmaströmung im Protoplasten zu beobachten ist (vgl. DRAWERT, 1949). Außerdem soll eine enge Verbindung zwischen Zellmembran und Plasma (MÜHLDOERF, 1937, 1938, DRAWERT, 1949) oder zumindest eine hohe Adhäsion des Plasmas an der Zellwand (v. CHOLNOKY, 1937) vorliegen. Als Ausnahme erwähnt KÜSTER (1929) die Plasmolisierbarkeit von Haarzellen von *Rivulariaceen*. Dagegen konnte PRÁT (1925) selbst an vacuolisierten Zellen von *Tolypothrix* keine normale Plasmolyse beobachten. Neuere positive Plasmolyseversuche liegen von KÜCHAR (1950) vor; es werden sowohl X-förmige Plasmolyseerscheinungen zweier benachbarten Zellen beschrieben als auch einseitiges Abheben des Protoplasten von der Membran. Gemeinsam ist fast allen Angaben, daß sich selbst benachbarte Zellen unterschiedlich verhalten, und daß bei Anwendung der gebräuchlichen Plasmolytika schnelle Deplasmolyse erfolgt.

Meine Plasmolyseversuche begannen an Zellen von *Fischerella thermalis* mit besonders großen Vacuolen. Einige Sekunden (5–15) nach Einführung des Plasmolytikums (1 mol KNO_3 , Objektträgerpräparate) hob sich der Protoplast im Bereich der Vacuole völlig gleichmäßig und leicht von der Membran ab. Bei randständigen Vacuolen drückte sich das dünne Plasmahäutchen, das die Vacuole ursprünglich von der Membran trennte, in einzelnen Fällen direkt in die Vacuole hinein. Dort hingegen, wo die Hauptmasse des Plasmas lag, löste sich der Protoplast nur stellenweise und dann geringer von der Wand, zugleich zeigte er hier unregelmäßige Konturen (Abb. 23). Bereits vor Ablauf einer Minute war die größtmögliche Kontraktion erreicht, und anschließend setzte sofort Deplasmolyse ein. Bei jüngeren, unvacuolisierten Zellen trat die bekannte Form der Krampfplasmolyse ein — für diese Zellen könnte also die DRAWERTSche Annahme einer Verwachsung von Plasma und Zellmembran zutreffen. Bei Anwendung anderer Plasmolytika (KCl , $NaCl$, $LiCl$) traten entsprechende Reaktionen auf, auch bei ihnen ging die Plasmolyse sofort in Deplasmolyse über.

Anders waren die Befunde bei 1 mol $CaCl_2$, wo der Protoplast seine starre Plasmolyseform in absehbarer Zeit nicht verlor. Auch PRÁT (1925) konnte bei Anwendung dieses Plasmolytikums selbst nach 6 Std noch keine Deplasmolyse beobachten. Hatte das Ca -Ion entquellend gewirkt, so setzte bei einer $KCNS$ -Plasmolyse eine Plasmaquellung ein, die so intensiv fortschritt, daß die Vacuolen stark

eingengt wurden, teilweise sogar nicht mehr zu erkennen waren, was der Tonoplastenplasmolyse höherer Pflanzen entspricht.

Auch bei *Gloeotrichia Pisum* trat Plasmolyse ein, und zwar hob sich der Protoplast am geringsten in den Zellen der meristematischen Zone von der Membran ab. Sowohl bei den noch nicht ganz ausgereiften Dauerzellen als auch bei ihren Nachbarzellen war die plasmolytische Wirkung dagegen stärker (Abb. 24a). Besaßen diese Zellen Vakuolen, so zeigten sie im plasmolysierten Zustand Stechapfelform (Abb. 24b); von der Vacuole war dann überhaupt nichts mehr zu erkennen. Am stärksten löste sich das Plasma in den vacuolisierten Haarzellen von der Membran. Einzelne bevorzugte Anheftungsstellen waren nicht zu erkennen. Im mittleren Abschnitt des *Rivularia*-Fadens lag häufig bei mehreren aufeinander folgenden Zellen die Stelle der stärksten Abhebung auf derselben Seite. Ähnliche Ergebnisse zeigten die vacuolisierten Zellen von *Cylindrospermum maius*, *C. alatosporum* und *Anabaena variabilis*.



Abb. 23.

Abb. 23. *Fischerella thermalis*. Plasmolyse vacuolisierten Zellen. P Protoplast, V Vacuole, M Membran, geht nach außen in eine dicke Schleimschicht (S) über.

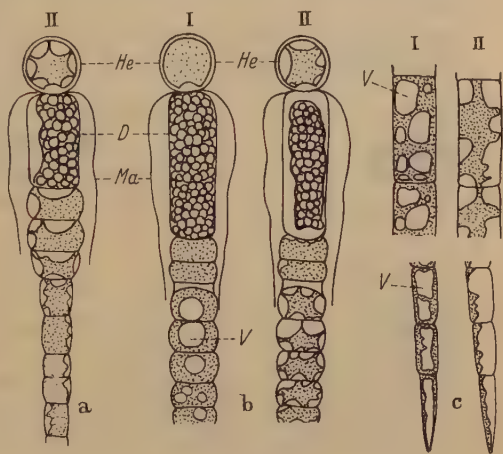


Abb. 24.

Abb. 24. *Gloeotrichia Pisum* mit 1 mol KNO_3 plasmolysiert. a Trichobasis mit noch nicht ganz ausgereifter Dauerzelle, b Trichom mit vacuolisierten Zellen, c Haarzellen. I unplasmolysiert, II plasmolysiert. He Heterocyste, D Dauerzelle, V Vacuole, Ma Manubrium.

Bei *Anabaena variabilis* wurden die Zellen vor der Plasmolyse mit Acridinorange gefärbt (Markierung der Zentralsubstanz). Trotz unregelmäßiger Plasmolyseform war zu erkennen, daß der Ort der Zentralsub-

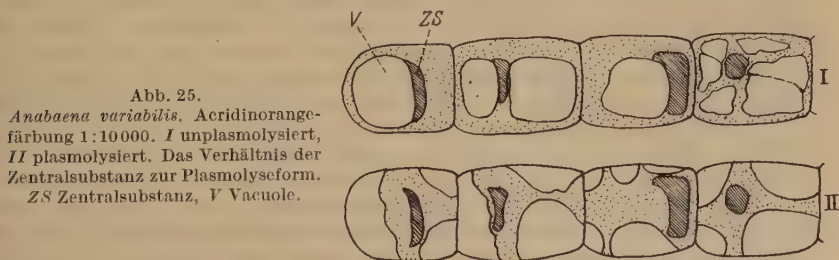


Abb. 25.

Anabaena variabilis. Acridinorange-färbung 1:10000. I unplasmolysiert, II plasmolysiert. Das Verhältnis der Zentralsubstanz zur Plasmolyseform. ZS Zentralsubstanz, V Vacuole.

stanz mit der stärksten Plasmaanhäufung zusammenfiel (Abb. 25). Diese Beobachtung ließ sich an *Cylindrospermum maius* und *C. alatosporum* bestätigen. Durch die Einwirkung des Plasmolytikums verloren die

Zentralsubstanzpartikelchen stellenweise stark an Größe (Abb. 26) und gingen auch wohl von der rundlichen in mehr eckige Form über.

Das Verhalten bei Einwirkung auf unvacuolisierte Zellen (der hier angeführten Arten sowie einiger *Oscillatorien*) stimmte hingegen mit den Beschreibungen in der Literatur überein. Hier traten nur die erwähnten Krampfplasmolysen auf.

Während die unvacuolisierte Blaualgenzelle also nur geringfügig — vereinzelt sogar überhaupt nicht — plasmolysierbar ist, nahm mit zunehmender Vacuolisation auch die Plasmolysierbarkeit zu; doch blieben meist einzelne Anheftungspunkte des Plasmas an der Membran bestehen. Die Zentralsubstanz befand sich dabei inmitten der stärksten Plasma-



Abb. 26. *Cyindrospermum alutoporum*. Acridinorangegefärbung 1:10000. Fluoreszenzbild. I Zentralsubstanz vor, II bei der Plasmolyse mit 1 mol KNO₃.

anhäufung; lag diese randständig, so hob sich hier das Plasma nicht oder nur wenig von der Membran ab. Konvexplasmolyse kam nur im Bereich der Vacuole vor. Die beobachtete unterschiedliche Entquellung von Zentralsubstanzpartikelchen könnte einer der Gründe sein, daß sich selbst benachbarte Zellen plasmolytisch verschieden verhalten.

Somit wäre die Annahme DRAWERTS bestätigt, daß die Zentralsubstanz den Turgor der Cyanophyceenzelle beeinflußt. Je weiter eine Zelle vacuolisiert ist, um so mehr entspricht ihr plasmolytisches Verhalten dem einer „normalen“ Zelle.

f) Die „Quellsubstanz“. (Zu den DRAWERTSchen Versuchen.)

Ausgehend von der Beobachtung, daß altes Herbarmaterial bei Wasserezugabe wieder turgescent wird, vermutet DRAWERT (1949), daß der Turgor der Cyanophyceenzelle weitgehend durch einen quellungsfähigen Stoff bedingt ist, der auch in totem Zustand die Fähigkeit hat, mit Wasser aufzuquellen. Zur experimentellen Bestätigung tötete DRAWERT *Oscillatoria Borneti*-Zellen mit Eau de Javelle ab, wobei sie farblos wurden und unter dem Mikroskop völlig leer erschienen. Bei Zugabe von 96%igem Alkohol wurde in der Zelle ein Inhaltskörper sichtbar, dessen Gestalt der Zellform entsprach. Mit Wasser quoll dieser Inhaltskörper wieder auf, und die Zellen bekamen ihre ursprüngliche Turgescenz zurück. Da alle turgeszenten Zellen gleichzeitig eine positive Glykogenreaktion gaben, nimmt DRAWERT einen Zusammenhang zwischen dieser „Quellsubstanz“ und dem Glykogen an. Weiterhin vermutet er, daß Quellsubstanz und Zentralsubstanz wahrscheinlich identisch seien.

Bei unvacuolisierten Fäden von *Oscillatoria animalis* und ähnlichen Formen konnte ich mit den gleichen Methoden DRAWERTS Beobachtungen bestätigen. Im Gegensatz dazu fiel bei vacuolisierten Zellen von

Fischerella thermalis auf, daß der Inhaltskörper auch im Endstadium Hohlräume aufwies. Bei eingehender Beobachtung zeigte sich hier, daß das eindringende Eau de Javelle wohl den Protoplasten entfärbt, aber nicht von der Membran abgehoben hatte. Erst bei Zugabe von Alkohol löste er sich und schrumpfte zusammen. Die Vacuolen waren dabei noch deutlich in verkleinerter Form wiederzuerkennen (Abb. 27). Demnach dürfte es sich bei dem quellungsfähigen Inhaltskörper um einen stark geschädigten Protoplasten handeln, dessen ursprüngliche Gestalt jedoch noch zu erkennen war.

DRAWERT hat ferner nachgewiesen, daß der Inhaltskörper, den er für die Zentralsubstanz hält, glykogenhaltig ist und schließt nun daraus, daß nur in der Zentralsubstanz Glykogen vorhanden sei.

Da mit der Jod-Jodkalium-Reaktion keine genaue Lokalisierung des Glykogens möglich war, wurde zusätzlich die BAUER-FEULGEN-Methode nach BENSLEY (GLICK, 1949) und die Reaktion nach GOMORI (GLICK, 1949) benutzt (zwei weitere Glykogen-Nachweismethoden). Mit der BAUER-FEULGEN-Methode trat an *Oscillatoria limosa*, *Phormidium papyraceum*, *Anabaena variabilis*, *Scytonema Hofmanni* und *Fischerella thermalis* eine Violettfärbung des ganzen Protoplasmas ein, die zur Peripherie hin etwas schwächer wurde. Eine Unterscheidung von Chromatoplasma und Zentralsubstanz war mit diesen Färbungsbildern nicht mehr möglich. Bei *Oscillatoria limosa*, *Phormidium papyraceum* und *Scytonema Hofmanni* waren die Endzellen und oftmals deren Nachbarzellen nicht violett gefärbt, sondern farblos, d. h. sie waren demnach glykogenfrei. Bei *Fischerella thermalis* färbten sich die jungen Zellen am intensivsten; hingegen gaben die alten, torulösen Zellen nur eine schwache Glykogenreaktion. Cyanophycinkörner waren immer glykogenfrei. Bei *Anabaena variabilis* gaben die Dauerzellen eine intensive Glykogenreaktion, während in vacuolisierten Zellen nur wenig Glykogen nachzuweisen war. Die Ergebnisse nach der GOMORI-Methode entsprechen diesen Beobachtungen.

Demnach ist Glykogen im ganzen Protoplasten, im Chromatoplasma wie in der Zentralsubstanz verteilt. Auch der Glykogennachweis läßt also vermuten, daß es sich bei der DRAWERTSchen „Quellsubstanz“ um den ganzen Protoplasten und nicht nur um die Zentralsubstanz handelt. Der Blaualgenprotoplast ist also als ganzes stark viscos und besitzt die Fähigkeit zur Quellung und Entquellung auch noch im denaturierten Zustand.

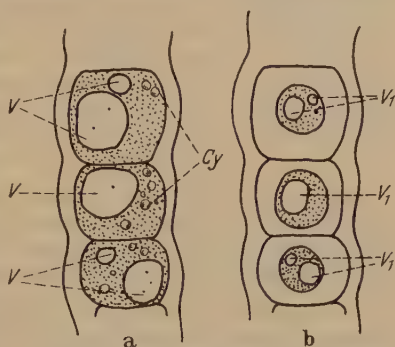


Abb. 27. *Fischerella thermalis*. a normales Trichomstück. In den Zellen sind Vacuolen (V) mit kleinen Partikelchen, die BROWNSCHE Molekularbewegung zeigten, und Cyanophycinkörner (Cy) vorhanden. b Nach Behandlung mit Eau de Javelle und Alkohol liegt der sogenannte „Quellkörper“ (DRAWERT) vor; da in ihm noch die verkleinerten Vacuolen (V₁) zu erkennen sind, muß es sich um den ganzen Protoplasten handeln.

3. Die chemische Natur der Zentralsubstanz.

Zweifellos fehlt den Blaualgen ein echter Zellkern, hingegen sind auch bei ihnen Substanzen nachzuweisen, die für den Zellkern typisch sind. Die Mehrzahl der daraufhin untersuchten Cyanophyceen enthalten Desoxyribonucleinsäure (DNS) (POLJANSKY und PETRUSCHEWSKY, 1929, NEUMANN, 1930, DELAPORTE, 1940, DUGHI, 1946, DRAWERT, 1949, BRINGMANN, 1950, 1952); DUGHI (1946) hat ohne histochemischen Nachweis angenommen, daß außerdem Ribonucleinsäure (RNS) vorhanden sei, was später BRINGMANN (1950, 1952) exakt nachgewiesen hat.

Über die Lokalisation der DNS werden zwei voneinander abweichende Darstellungen gegeben.

Nach POLJANSKY und PETRUSCHEWSKY (1929) liegt sie im Zentralkörper in Form eines Netzwerkes vor. Dieses wird allgemein als Chromidialapparat bezeichnet und soll dem Centroplasma GEITLERS bzw. der Zentralsubstanz eingelagert sein. Nach DUGHI (1949) besteht der Zentralkörper aus dem Chromidialapparat und einem „Nucleoplasma“. DELAPORTE (1940) fand einen Axialstrang, DA CUNHA (1935) im Zentralkörper liegende Körner, die FEULGEN-positiv reagierten. DRAWERT (1949) entdeckte bei *Oscillatoria Borneti* FEULGEN-positive Körner, die ausschließlich im Plasma verstreut lagen; bei einem Teil der Trichome fehlte sogar eine positive Reaktion auf DNS völlig.

Im Gegensatz dazu läßt sich nach BRINGMANN (1950) eine FEULGEN-positive Reaktion nur nach Lanthanfällung erreichen. BRINGMANN kennt bei seinen Versuchen keinen Chromidialapparat; er spricht nur von basophilen Grana¹.

a) Nachweis der Desoxyribonucleinsäure nach der FEULGEN-Methode.

Die Algen wurden in 96%igem, reinem Äthylalkohol² fixiert und in 1 n HCl bei 60° C im Trockenschrank hydrolysiert. Anschließend wurde das Material in fuchsin-schweflige Säure (SCHIFFSches Reagens) gebracht und in SO₂-haltigem Wasser gespült. (Eingehende Angaben siehe MILOVIDOV, 1936.)

Bei *Oscillatoria limosa* war in der Mehrzahl der Zellen das Auftreten rot-violetter Grana — ganz wie bei BRINGMANN (1950) — zu beobachten, folglich enthielten die Zellen DSN. Die Grana lagen größtenteils in der Zellmitte, vereinzelt jedoch auch mehr peripher; daneben gab es Zellen, in denen statt einzelner Grana deutlich die ganze Zentralsubstanz völlig homogen gefärbt war. Während bei alten Kulturen fast alle Trichome von *Oscillatoria limosa* positiv reagierten, war das bei intensiv wachsenden jungen nur vereinzelt der Fall. Hier trat in allen Zellen eine schwach positive Reaktion bei Lanthanfällung ein [$1/_{25}$ mol La(NO₃)₃] — allerdings erst nach längerer Hydrolyse (CASPERSSON, HAMMARSTEN und HAMMARSTEN, 1935, u. a.).

Auch alte Zellen von *Fischerella thermalis* ergaben stets positive Reaktionen, die jedoch über den Protoplasten verstreut und meist im Zellzentrum am stärksten

¹ Die Arbeit von BRINGMANN „Die Organisation der Kernäquivalente der Spaltpflanzen unter Berücksichtigung elektronenoptischer Befunde“ (Zentralbl. f. Bakteriologie, 2. Abt. 107, 40—70, 1952) ist erst nach Abschluß dieser Arbeit erschienen und konnte nicht mehr berücksichtigt werden.

² Im Laufe der Untersuchungen ergab sich, daß nur frisch überdestillierter Alkohol zum Fixieren brauchbar war; bei etwas gealtertem trat keine Nuclealreaktion mehr ein.

waren. In Hormogonien und anderen meristematischen Zellen wurde keine positive FEULGEN-Reaktion festgestellt. In allen untersuchten Fällen waren die Cyanophycinkörner eindeutig FEULGEN-negativ. Überall dort, wo die Zentralsubstanz als Zentralkörper vorlag, beschränkte sich die Reaktion auf die Zellmitte. Demnach ließe sich die über den ganzen Protoplasten verteilte Reaktion bei alten *Fischerella thermalis*-Zellen mit deren aufgeteilter Zentralsubstanz erklären.

Auffallend ist, daß ich, wie BRINGMANN, immer nur Grana, aber nie einen Chromidialapparat fand. Wahrscheinlich ist das auf die von ihm und mir gleicherweise verwandte Alkoholfixierung zurückzuführen, die wohl andere Denaturierungserscheinungen veranlaßt, als die anderen Fixierungsmethoden.

b) Nucleinsäure-Nachweis mit Hilfe von Pyronin und Methylgrünessigsäure.

Neuerdings werden Nucleinsäuren mit Hilfe von Pyronin und Methylgrünessigsäure nachgewiesen. Pyronin färbt RNS-haltige Strukturen rot (BRACHET, 1940a, 1940b; BRINGMANN, 1950; KURNICK, 1950, u. a.), Methylgrün färbt spezifisch DNS-haltige Strukturen im schwach sauren Bereich blau; deswegen der Zusatz von Essigsäure (v. PLOTHO, 1940; POLLISTER und LEUCHTENBERGER, 1949; KURNICK, 1950, u. a.). Allerdings kann Methylgrün im wesentlichen nur die hochpolymere Form der DNS nachweisen (KURNICK, 1950), während depolymerisierte DNS nur von Pyronin gefärbt wird.

Zunächst wurden *Oscillatoria limosa*, *O. animalis*, *Lyngbya aeruginosa-coerulea*, *Cylindrospermum maius*, *Fischerella thermalis* und *Scytonema Hofmanni* mit Pyronin auf RNS untersucht. — Nach Alkoholfixierung traten meist im Zellzentrum, vereinzelt auch peripher, rote Grana auf. In Dauerzellen von *Anabaena variabilis* und in der Mehrzahl der alten, torulösen Zellen von *Fischerella thermalis* war keine Reaktion zu erkennen. Bei *Scytonema Hofmanni* war in den alten Zellen wegen der Schleimscheide eine Reaktion nicht feststellbar. Bei Vitalfärbung war — genau wie bei Acridinorange — zunächst die ganze Zentralsubstanz angefärbt. Nach längerer Färbung bildet sich die Zentralsubstanz zu ringförmig aussehenden Grana um, die in Größe und Lage den „Ringkörpern“ der Literatur (vgl. GEITLER, 1936, DUGHI, 1946, u. a.) entsprachen. Vacuolisierte Zellen zeigten bei *Nostocaceen* höchstens eine ganz geringe, bei *Fischerella thermalis* keinerlei Reaktion. In keinem Fall färbte Pyronin die Cyanophycinkörner.

Methylgrünessigsäurefärbung zum Nachweis von DNS ergab bei *Lyngbya aeruginosa-coerulea*, *Oscillatoria limosa*, *O. animalis*, *Cylindrospermum maius* und *Anabaena variabilis* folgendes Bild: Meist im Zellzentrum, vereinzelt auch peripher, lagen blaue, oft ringförmig gebildete Grana; bei *Scytonema Hofmanni* war es ebenso, soweit die Schleimscheide eine Beobachtung zuließ. Bei *Fischerella thermalis* zeigten junge Hormogonien keine deutliche Blaufärbung, wohl aber etwas ältere Zellen. Am deutlichsten färbten sich alte, torulöse Zellen. — Die Cyanophycinkörner färbten sich in keinem Fall mit Methylgrünessigsäure.

Die durch die Pyroninfärbung (nach Alkoholfixierung) und die Methylgrünessigsäurebehandlung anfärbbaren Bestandteile lagen übereinstimmend in der Zellmitte und waren auf Grund der Vitalfärbung mit Pyronin identisch mit der Zentralsubstanz, die demnach sowohl RNS als DNS enthalten muß.

Der Nachweis des DNS- und RNS-Gehaltes wurde auch noch dadurch erbracht, daß vor Anwendung der Pyronin- und Methylgrünessigsäurefärbung versucht wurde, die Nucleinsäuren herauszulösen.

Man kann die RNS durch Ribonuclease, ein Ferment aus Rinderpankreas (BRACHET, 1941; KUNITZ, 1940) oder durch heiße Hydrolyse mit 1 n HCl bei 60° C (VENDRELY, 1949, ORTMANN, 1949, STICH, 1951, METZNER, 1952) entfernen. Eine einwandfreie Methode zum Herauslösen der DNS allein liegt bislang noch nicht vor. Am besten schien mir die Anwendung von 20% iger Trichloressigsäure bei 90° C, die beide Nucleinsäuren sicher und restlos herauslöst (KAUFMANN, McDONALD und GAY, 1951; METZNER, 1952).

Nach Behandlung mit heißer HCl ließ die Färbbarkeit durch Pyronin bei *Oscillatoria limosa*, *Lyngbya aerugineo-coerulea* und *Cylindrospermum maius* stark nach und hörte schließlich ganz auf. (Die Verminderung der Methylgrünfärbung erklärt sich aus der Depolymerisation der DNS.) Nach Anwendung heißer Trichloressigsäure bei *Oscillatoria limosa*, *O. animalis*, *Anabaena variabilis*, *Cylindrospermum maius*, *Scytonema Hofmanni* und *Fischerella thermalis* fehlte schon nach 5—10 min jede Färbung; Kontrollen mit kalter Trichloressigsäure ließen sich unverändert färben.

Der positive Ausfall der Reaktionen mit Pyronin und Methylgrünessigsäure ist also tatsächlich auf Vorhandensein der beiden Nucleinsäuren in der Zellmitte — der Zentralsubstanz — zurückzuführen.

c) Weitere Färbeversuche.

Bei den gleichen Objekten ließ sich außer mit Metylenblau die Zentralsubstanz unter anderem mit Rosanilin und Victoriablau, zwei basischen Diachromen, färben. (LETTRE hat neuerdings wieder gezeigt, daß Victoriablau eine ausgesprochene Affinität zu Nucleinsäure enthaltenden Strukturen besitzt.) Auch die Fluorochrome Auramin und Acridin färbten die Zentralsubstanz; beide Farbstoffe sollen sich nach STRUGGER (1949) wie basische Diachrome verhalten. Fluorescein färbte das Chromatoplasma intensiv; ob dabei auch die Zellmitte gefärbt war, konnte nicht einwandfrei entschieden werden. Dagegen drang Primulin nicht in die Zelle ein.

Trypaflavin soll nach Mc ILWAIN (1942), LETTRE (1946, 1949), BAUCH (1947, 1948, 1949) und STICH (1951) nucleinsäurehaltige Bereiche der Zelle färben. Man schloß das aus folgendem: In Riesenchromosomen konnte die Speicherung in den Querbändern festgestellt werden, dort, wo CASPERSSON (1941) Nucleoproteide nachgewiesen hat (vgl. BAUCH 1948, 1949); bei der Mitose erfolgt eine partielle Verklebung der Tochterchromatiden, was zur Störung im Zellteilungsgeschehen Anlaß gibt. Besonders die Arbeit von STICH (1951) zeigt mit Hilfe von enzymatischen Versuchen und hydrolytischer Spaltung, daß Trypaflavin sowohl im Plasma als auch im Kern von RNS- und DNS-haltigen Zellstrukturen gespeichert wird. Danach war für Trypaflavin ein Färbungsbild entsprechend dem der übrigen oben erwähnten basischen Farbstoffe und Acridinorange zu erwarten.

Die Versuche an *Anabaena variabilis*, *A. cylindrica*, *Oscillatoria brevis*, *Phormidium papyraceum*, *Lyngbya Martensiana* und *Calothrix marchica* mit Trypaflavin hatten aber überraschenderweise ein wesentlich anderes Ergebnis. Die Cyanophycinkörner zeigten eine intensive grellgrüne Fluoreszenz.

Die Identität der gefärbten Grana mit den Cyanophycinkörnern war durch den Vergleich mit dem Hellfeldbild leicht und sicher festzustellen. Bei manchen Arten mit wenig oder keinen Cyanophycinkörnern war außerdem eine matte, grünlich bis gelbrote Tönung der Zentralsubstanz zu beobachten, die von der Farbe etwa anwesender Cyanophycinkörner leicht überdeckt werden konnte.

In manchen Fällen, z. B. bei *Oscillatoria limosa*, fehlte jedes Färbungsergebnis mit Trypaflavin. In älteren *Fischerella thermalis*-Zellen verteilte sich die matte Fluoreszenz über die ganze Zelle, genau wie bei der Zentralsubstanzfärbung durch Acridinorange. Im pH-Bereich von 4,6—8,2 war die Trypaflavinfärbung vom pH unabhängig. Eine HCl-Hydrolyse beeinträchtigte die Trypaflavinfärbung wie auch die mit Acridinorange nicht wesentlich. Dagegen trat nach Behandlung mit 20%iger Trichloressigsäure weder eine Acridinorangegefärbung der Zentralsubstanz noch eine Trypaflavinfärbung der Cyanophycinkörner ein.

Die Färbung der Cyanophycinkörner mit Trypaflavin wie auch die Zentralsubstanzfärbung mit Acridinorange lassen sich also durch die gleiche Vorbehandlung verhindern wie die Methylgrünessigsäurefärbung.

4. Die Zellstruktur der *Beggiatoaceen*.

Während man die *Beggiatoaceen* früher zu den Bakterien stellte, weist man ihnen jetzt (PRINGSHEIM, 1949, RIPPEL-BALDES, 1949, 1952, u. a.) ihren Platz bei den Cyanophyceen als farblos gewordene Blaualgen an. Über die Feinstruktur ihrer Zellen besteht durchaus noch keine Klarheit.

Während BÜTSCHLI (1896) an *Beggiatoa alba* und *B. media* sowie an einer Kieler *Beggiatoa*-form (wohl *mirabilis*) das Vorhandensein eines Zentralkörpers beobachtet hatte, konnte MACALLUM (1899) weder bei *Beggiatoa mirabilis* noch bei *B. alba* etwas derartiges finden. Der von BÜTSCHLI beschriebene Zentralkörper soll wabige Struktur gezeigt und mitunter sogar Hohlräume enthalten haben. HINZE (1901) beschreibt für *Beggiatoa* ebenfalls einen Zentralkörper, der von einer großen Vacuole erfüllt ist. GUILLIERMOND (1926) konnte hingegen mit Methyleneblau bzw. Cresylblaufärbung nur metachromatische Korpuskeln feststellen, und auch diese waren nicht einmal in allen Fällen vorhanden; er nimmt an, daß es sich dabei um Fällungsprodukte des Zellsaftes handelt. Ein Analogon zu dem Zentralkörper der Cyanophyceen konnte er nicht feststellen. Nach TUROWSKA (1935, zitiert nach DELAPORTE, 1940) liegt manchmal das „Chromatin“ — mit Kernfarbstoffen anfärbbare Strukturen — um die Vacuole herum.

Eigene Untersuchungen verschiedener Varianten der Kieler *Beggiatoa mirabilis*¹ ergaben folgendes: im Protoplast war zum Teil BROWNSCHE Molekularbewegung zu beobachten, er war also wesentlich dünnflüssiger als der der Cyanophyceen. Er enthielt stets viele kleine oder wenige große Vacuolen. Einen basophilen Bereich, der der Zentralsubstanz der typischen Cyanophyceenzelle entsprechen könnte, konnte ich in keinem Fall finden. Allerdings war bisweilen unmittelbar um die Vacuole eine andersgeartete Plasmaschicht zu erkennen. Die Vacuolen färbten sich

¹ Herrn Prof. HOFFMANN, Institut für Meeresforschung in Kiel, danke ich verbindlichst für die wiederholte Besorgung des Materials.

mit Neutralrot stets gut an; daneben konnten hin und wieder eine Membran- und eine diffuse Plasmafärbung beobachtet werden.

Zu diesem Befund ist eine Angabe von DELAPORTE (1940) von Bedeutung, wonach sich ein zentraler Chromatinbereich nur in ganz jungen *Beggiatoen*zellen findet, während in alten Zellen höchstens einzelne Chromatinkörnchen zu erkennen seien. Diese Beobachtung würde die widersprechenden Befunde in der Literatur verständlich machen, da vermutlich jeweils verschiedene Altersstadien untersucht wurden.

Aus unseren Beobachtungen ergibt sich also ein deutlicher Unterschied im Entwicklungsprozeß von *Beggiatoa* und einer einfachen *Hormogonale*, etwa einer *Oscillatoria*, die normalerweise ständig teilungsfähig und vacuolenfrei, d. h. in ihrem Jugendstadium bleibt. Bei *Beggiatoa* tritt dagegen sehr bald eine plasmatische Veränderung ein, wie sie bei den höheren Blaualgen, allerdings erst im Laufe einer längeren Entwicklung, als typisches Altersmerkmal zu beobachten ist.

II. Diskussion.

Chromatoplasma. Die vorstehend geschilderten Versuche zeigen — übereinstimmend mit den Literaturangaben — sowohl nach dem Hellfeldbild als auf Grund der Eigenfluoreszenz, daß bei den Cyanophyceen eine periphere, chlorophyllhaltige Plasmaschicht, das Chromatoplasma, vorhanden ist.

Zentralkörper. Über die Struktur der Zellmitte gibt es hingegen in der Literatur sehr verschiedene Vorstellungen. Manche Autoren (ZACHARIAS, 1890 ff., BÜTSCHLI, 1896, GUILLIERMOND, 1906 ff., DRAWERT, 1939, u. a.) beschreiben einen zusammenhängenden, zentralen Bereich, den Zentralkörper. Er wurde auch von mir beobachtet.

Er findet sich in allen teilungsfähigen Cyanophyceenzellen, d. h. allen normalen *Oscillatorien*-Zellen, vegetativen *Nostocaceen*-Zellen, Zellen der meristematischen Zone der *Rivulariaceen*, der Hormogonien und Trichomspitzen der verzweigten Formen mit apikalem Wachstum. Auch die die äußere Zellform etwa kopierende Gestalt des mit Acridinorange sichtbar gemachten Zentralkörpers stimmt mit früheren Beschreibungen weitgehend überein. Wenn bei einigen *Oscillatorien* die Zentralsubstanz unregelmäßig gestaltet und mit Anastomosen versehen ist, so dürfte das auf einem wechselseitigen Durchdringen von Chromatoplasma und Zentralsubstanz beruhen, wie es auch DUGHI (1946) annimmt. Ein diffuser Übergang der Zentralsubstanz in das Chromatoplasma — wie es einige ältere Autoren annehmen — scheint nicht vorzuliegen. An einigen günstigen Fällen konnte ich erkennen, daß die Zentralsubstanz farblos ist.

Durch Druck lassen sich vereinzelt Zellen aus ihrem Verband lösen. Da stets in solchen Fällen die Zellteilung beendet ist, zieht sich auch entlang der Quermembran ein dünner Chromatoplasmasaum. Dadurch kann eine Grünfärbung der Zellmitte vorgetäuscht werden (STROB 1938), die in Wirklichkeit nicht vorhanden ist.

Nach anderen Beobachtern sollen statt eines zusammenhängenden Zentralkörpers mehrere Partikelchen der Zentralsubstanz vorliegen.

BAUMGÄRTEL (1920) spricht von Endoplasten (siehe auch GEITLER, 1922ff., v. CHOLNOKY, 1937, STROH, 1938, u. a.). PRÁT (1925) hat in Mangelkulturen gelegentlich „Zentralkörner“ gefunden, und GUILLIERMOND (1906) beschreibt, daß in den Haarzellen einer *Rivulariacee* statt des Zentralkörpers einzelne Körner vorlagen.

Nach unseren Beobachtungen tritt mit Alterung der vegetativen Zelle eine Aufteilung der Zentralsubstanz in Grana ein [bereits von HIERONYMUS (1892) für *Tolypothrix* angegeben]. Die gleiche Veränderung der Zentralsubstanz findet sich auch bei der Umbildung von vegetativen Zellen zu Dauerzellen, z. B. bei *Nostocaceen*, was auch ein Alterungsvorgang ist.

Im Gegensatz zu höheren Blaualgen wird bei *Oscillatorien* eine Alterung der Zellen — und damit eine Aufteilung der Zentralsubstanz in einzelne Partikelchen — durch Außenfaktoren bedingt.

Centroplasma. Wie DRAWERT (1949) angibt, und wie die eigenen Versuche bestätigt haben, dürfte es in der Blaualgenzelle nichts geben, was dem Centroplasma BAUMGÄRTELS und GEITLERS entspricht¹.

Nucleinsäuren. Chemisch sollen in der Zellmitte Nucleinsäuren vorhanden sein (POLJANSKY und PETRUSCHEWSKY, 1929, u. a., DNS, außerdem BRINGMANN, 1950, RNS). DNS soll als chromatisches Netz (Chromidialapparat) oder in Form feiner Körner, RNS in Form basophiler Grana vorliegen. Nach NEUGNOT (1950) kann die basophile Substanz — nachgewiesen nach ROBINOW — verschiedene Formen, zentrale, kompakte Bereiche, Grana oder Fäden aufweisen.

Die vorstehenden Versuche haben eine gleichmäßige, starke Basophilie der Zentralsubstanz ergeben und zeigen — übereinstimmend mit den grundlegenden Arbeiten von HAMMARSTEN, HAMMARSTEN und TEORELL (1920), CASPERSSON (1941) und BRACHET (1942) u. a. — daß diese auf Nucleinsäuregehalt beruht. Die Zentralsubstanz hat also Kernfunktion (vgl. BRINGMANN 1950, 1952). Die streng auf die Zentralsubstanz beschränkte, homogene Verteilung der Ribonucleinsäure ist durch Vitalfärbung mit Pyronin erwiesen, während nach Alkoholfixierung die RNS in Form von Grana vorliegt. Desoxyribonucleinsäure konnte nur an fixiertem Material mit Hilfe der Methylgrünessigsäure oder der FEULGEN-Methode in Granaform nachgewiesen werden.

Acridinorange, mit Pyronin konstitutionschemisch verwandt, gehört zu der Gruppe der Acridine, die nach WAGNER-JAUREGG (1936, 1943) mit Nucleinsäuren salzartige Verbindungen geben. Nachdem die Acridinorangefärbung der Querbanden von Chromosomen (STRUGGER, 1940), in denen CASPERSSON (1942) Nucleinproteide fand, den Zusammenhang dieser Färbung mit Nucleinsäuren vermuten ließ, haben GÖSSNER (1949) und ZEIGER, HARDERS und MÜLLER (1951) die Bindung von Acridinorange an Nucleotiden nachgewiesen.

Bei unseren Beobachtungen konnte nach Entfernen der RNS aus den Zellen noch homogene Acridinorangefärbung festgestellt werden, nach Extraktion aller

¹ Nach Angabe dieser Autoren soll sich in der Zellmitte ein farbloses Plasma befinden, in das die Endoplasten eingebettet sind. Vgl. hierzu auch die auf S. 174 angeführte französische Literatur.

Nucleinsäuren trat überhaupt keine Färbung mehr auf. Daraus ergibt sich, daß die DNS mit für die Acridinorangefärbung verantwortlich sein muß¹.

Chromidialapparat. Er wurde niemals beobachtet. Da Nucleinsäuren leicht an der Bildung postmortalen Strukturen wie Netze und Körner beteiligt sind (P. W. MAKAROW nach KRUKOW, 1950), könnten die Grana sowohl bei Pyronin- und Methylgrünessigsäurefärbung, als auch die Grana und das chromatische Netz nach der FEULGEN-Reaktion Denaturierungsprodukte sein. Ob Netz- oder Granaform vorliegen, scheint von der jeweils angewandten Fixierungsmethode abzuhängen.

Zu den Acridinen gehört auch Trypaflavin, ein Mitosegift (LETTRE und LETTRE 1946), das neben DNS- auch RNS-haltige Strukturen angreift (STICH 1950). Bemerkenswerterweise stimmen die vorstehend mitgeteilten Ergebnisse der Trypaflavinfärbung mit denen der angewandten Nucleinsäurenachweise nicht überein, wenn man von der gelegentlichen schwachen Anfärbung der Zentralsubstanz abieht.

Cyanophycinkörner. Jedoch färbt Trypaflavin intensiv die Cyanophycinkörner, die weder Phosphor noch Eisen enthalten sollen (MACALLUM, 1899), während nach GUILLIERMOND (1926) ihre Proteinnatur feststeht. Demnach könnten sie keine Nucleinsäuren enthalten. Vermutlich spielen die Eiweiße bei diesen Färbungen eine Rolle. Möglicherweise besteht auch ein Zusammenhang zwischen Zentralsubstanz und Cyanophycinkörnern.

Metachromatinkörner. Sie sind durch Fällung bedingte Kondensationsprodukte bestimmter Kolloide (DANGEARD nach GUILLIERMOND, 1930) und sollen mit den Volutinkörnern A. MEYERS (1904) identisch sein. Nur BRANDT (1941) macht bei Hefen einen Unterschied. BAUMGÄRTEL (1920) nennt diese Gebilde Epiplasten. Wie MEYER (1904) vermutete, enthält Volutin Nucleinsäuren, und zwar DNS (DELAPORTE und RHOUKELMAN, 1938, DELAPORTE, 1940, CASPERSSON und BRANDT, 1941). Von den Metachromatinkörnern, die nach Literaturangaben sowohl im Zentralkörper als auch im Chromatoplasma gesehen wurden, sollen zumindest die größeren zweischichtig sein. Aber DUGHI (1946) zeigte bereits, daß diese

¹ Zwischen jungen und alten Zellen können Unterschiede in Art und Bindung der Nucleinsäuren bestehen. Embryonale und intensiv wachsende Zellen haben einen großen RNS-Gehalt, der mit fortschreitender Entwicklung abnimmt. Nach GORBUNOWA (1950, mir leider erst nach Abschluß meiner Untersuchungen zugänglich geworden) vermindert sich auch bei *Gloeotrichia Pisum* mit zunehmendem Alter der RNS-Gehalt. Die eigenen Versuche mit Pyronin und Methylgrünessigsäurefärbung zeigen einen größeren RNS-Gehalt in jungen *Fischerella thermalis*-Zellen, während in älteren mehr DNS nachzuweisen ist. Nach unserer Kenntnis von der Bedeutung der DNS für die Zellteilung müssen wir DNS auch in jungen Zellen annehmen. Da sie leicht extrahierbar ist, könnte sie durch die Alkoholfixierung aus jungen Zellen herausgelöst worden sein. Dies scheint auf verschiedene Bindungsarten in Jugend und Alter hinzudeuten. So beobachtete auch CERUTI (1949) an jungen Blütenanlagen mit zunehmendem Alter eine „gewisse Festigkeit der Verbindung des Nucleins mit dem anucleinischen Protein“. Da Lanthansalze Nucleoproteide fällen (HAMMARSTEN, HAMMARSTEN und TEORELL, 1928, u. a.), wäre dann verständlich, daß BRINGMANN (1950) nur nach Lanthanbehandlung — vermutlich bei physiologisch jungen Zellen — eine positive FEULGEN-Reaktion erreichen konnte. Eigene Beobachtungen an *Oscillatoria limosa* und *Fischerella thermalis* scheinen auch in diese Richtung zu weisen.

zweischichtigen Körner denaturierte Zentralsubstanz darstellen, was meine eigenen Färbungen nach Fixierung oder Säurebehandlung bestätigen. Auch die basophilen Grana BRINGMANNs (1950) sind hierher zu rechnen. Sehr wahrscheinlich wird außerdem in vielen Fällen von Metachromatinkörnern gesprochen, wo kleine Zentralsubstanzgrana um den Zentralkörper verteilt liegen (vgl. Abb. 7a und 8a), z. B. bei *Tolypothrix*, auf das sich DUGHI bezieht.

Die Metachromatinkörner sind demnach färbbare Zentralsubstanzpartikel, die entweder schon in der Zelle vorlagen oder durch Denaturierung entstanden sind.

Vacuolen. Während GEITLER (1936, S. 12) meint, daß die Vacuolen in bestimmten Abschnitten vielzelliger Cyanophyceen wohl allgemein im Chromatoplasma und meist an der Peripherie der Querwände entstehen, sieht DANGEARD (1933) im Zentralkörper wegen seiner Färbbarkeit mit Neutralrot eine Vacuole, aus der die echte durch Entmischung entstehen soll. Das Vacuolensystem heißt bei ihm „Vacuom“. Auch MEYER (1904) hält die Zentralsubstanz für eine Vacuole des Cytoplasmas mit zähflüssigem Inhalt.

Auch die vorstehenden Beobachtungen lassen bei der Entstehung der Vacuolen einen gewissen Zusammenhang zwischen diesen und der Zentralsubstanz erkennen, wie ihn auch GUILLIERMOND (1906ff.), BECKER und BECKEROWA (1937) u. a. fanden, ohne diesem Problem jedoch weiter nachzugehen¹.

Die Zentralsubstanz lag häufig müthenförmig der Vacuole an oder umgab sie in Form mehrerer Partikel. Außerdem nahm mit wachsender Vacuolisation der Zellgehalt an Zentralsubstanz ab, bis unter Umständen nichts mehr von ihr zu finden war. (Vgl. hierzu auch die negative FEULGENreaktion bei *Oscillatoria Borneti* nach DRAWERT, 1949.) Kurz vor dem Erscheinen der Vacuolen machte die Zentralsubstanz den Eindruck, als wenn sie sich im Übergang vom Gel zum Sol befände.

Wie die verschiedene Gestalt der Zentralsubstanz, so ist auch die Vacuolenbildung eine Folge der Zellalterung, die bei niederen Blaualgen durch Außenfaktoren bedingt ist, bei höheren Formen jedoch als natürlicher Entwicklungsprozeß eintritt. Die echten Vacuolen haben dünnflüssigen Inhalt mit BROWNScher Molekularbewegung; doch sind die bewegten Partikelchen gewiß keine Metachromatinkörner, da sie sich nie anfärben.

Sollte tatsächlich — wie es nach dem mikroskopischen Bild aussieht — bei der Vacuolenbildung die Zentralsubstanz verschwinden, so hätte das natürlich sehr weitgehende Konsequenzen für die Deutung der letzteren als Träger der Kernfunktion (BRINGMANN, 1950, 1952). Da die Vacuolen nur in den alternden Zellen auftreten, wären sie eventuell als ein Zeichen für Zellsenilität aufzufassen, wobei dann sehr wahrscheinlich auch die ganze Steuerung des

¹ In gewisser Beziehung zu dem hier interessierenden Problem stehen auch Angaben in den Arbeiten von DANGEARD (1908, zitiert nach GUILLIERMOND, 1930), KÜSTER (1921, 1935), GUILLIERMOND (1930), GICKELHORN (1931), RESÜHR (1936), FREY-WYSSLING (1938), LEPESCHKIN (1938) und WADA (1938).

Zellgeschehens durch die Zentralsubstanz als Kernäquivalent in Unordnung käme¹.

Plasmolyse. Während junge Blaualgenzellen keine echte Plasmolyse zeigen, verhalten sich alte zumindest im Bereich der Vacuole wie Zellen höherer Pflanzen. DRAWERTS Ansicht (1949), daß Membran und Plasma miteinander verwachsen seien, könnte demnach nur für junge Zellen zutreffen, da MÜHLDOFF (1937, 1938) die plasmatische Herkunft der Quermembranen nachgewiesen hat. Unterschiedliches plasmolytisches Verhalten gleich aussehender Zellen kann nach den vorstehenden Versuchen auf verschiedene Entquellbarkeit der Zentralsubstanz zurückgehen. Diese Beobachtung und die gequollenen „Übergangsstadien“ der Zentralsubstanz bestätigen die Annahme DRAWERTS: Der Turgor der Cyanophyceenzelle beruht auf einem Quellungsmechanismus, ein Satz, der aber nur Gültigkeit haben kann, soweit nicht echte Vacuolen vorliegen. Das Plasma der Blaualgenzelle entspricht in seinem Plasmolyseverhalten weitgehend dem höherer Pflanzenzellen, wie seine Reaktionen auf CaCl_2 und KSCN gezeigt haben (siehe auch KUCHAR, 1950).

Daß bei *Oscillatorien* häufig eckige Zellsafträume auftreten — im Gegensatz zu den mehr rundlichen Vacuolen anderer Cyanophyceen — könnte seine Ursache in der Plasmaviskosität haben. Da nach unseren Beobachtungen die Vacuolen der *Oscillatorien* durch die gleichen Vorgänge entstehen wie bei allen anderen Blaualgen, dürfte es zweckmäßig sein, den Begriff „Keritomie“ in Zukunft nicht mehr zu verwenden.

Heterocysten. Über sie läßt sich auf Grund dieser Arbeit nur sagen, daß sie einen Zentralkörper wie die vegetative Zelle besitzt. Demnach ist die Voraussetzung für Teilungs- bzw. Keimungsvorgänge (GEITLER, 1921, STEINECKE, 1932, u. a.) erfüllt. Die Annahme, die Teilungsfähigkeit müsse erst wiedergewonnen werden (FRITSCH, 1951), ist entbehrlich.

Die gesamten Beobachtungen ergeben folgendes Bild vom Aufbau und der Entwicklung der Blaualgenzelle: Die normale, vegetative Zelle enthält peripher eine chlorophyllhaltige plasmatische Grundsubstanz, das Chromatoplasma, und in der Mitte eine farblose Zentralsubstanz, die normalerweise als zusammenhängende Masse in Form eines Zentralkörpers vorliegt. Der DNS- und RNS-Gehalt kennzeichnet diese Substanz als Kernäquivalent, dessen Quellfähigkeit in diesem unvacuolisierten Zustand sonderbarerweise weitgehend den Turgor der Cyanophyceenzelle zu bedingen scheint.

Die vegetativen Zellen differenzieren sich aus ihrem meristematischen Zustand bei primitiven Blaualgen, soweit überhaupt möglich, auf Grund von Außenfaktoren, bei höheren Formen nach inneren Entwicklungsgesetzen in folgender Art: Es zeigen sich zwei polar entgegengesetzte

¹ Quellungserscheinungen des Zellkernes (MIGULA, 1888; SAKAMURA, 1933, letzterer zitiert nach TISCHLER, 1934) und Vacuolenbildung im Kern (BELAR, 1930, zitiert nach TISCHLER, 1934) bringt TISCHLER (1934) mit DNS in Zusammenhang.

Differenzierungen. Einerseits können Dauerzellen gebildet werden, wobei der Zentralkörper vollständig in Grana aufgeteilt wird, gleichzeitig bilden sich Cyanophycinkörner. Andererseits altern die Zellen so, daß dabei aus oder in der Zentralsubstanz Vacuolen entstehen; im Extremfall ist von der Zentralsubstanz nichts mehr zu finden (bestes Beispiel *Gloeo-trichia Pisum*).

Nur die höchsten Blaualgenformen zeigen im Lauf ihrer natürlichen Entwicklung alle Entwicklungsmöglichkeiten der meristematischen Zelle. Die Mehrzahl der Blaualgen verbleibt normalerweise im meristematischen Zustand¹.

Zusammenfassung.

1. Mit Hilfe der Acridinorangefärbung (und anderen basischen Vitalfarbstoffen) wurde die „Zentralsubstanz“ als Bestandteil der Zellmitte in jeder normalen Blaualgenzelle festgestellt. Die Basophilie der „Zentralsubstanz“ beruht auf homogen verteiltem Nucleinsäuregehalt, der diese Zellstruktur als Kernäquivalent kennzeichnet. Die Zentralsubstanz ist farblos und bedingt die hellere Pigmentierung der Zellmitte.

Die Zentralsubstanz kommt in teilungsfähigen Zellen in Form eines geschlossenen Körpers, des Zentralkörpers, vor. Mit zunehmendem Zellalter teilt sie sich in einzelne Partikel auf. In alten Zellen und Dauerzellen liegen nur noch Zentralsubstanzpartikelchen vor.

Ein Centroplasma konnte nicht gefunden werden.

2. Vacuolen innerhalb des normalen Entwicklungsganges konnten an 2 Formen beobachtet werden. Sie traten nur in alten Zellen (alte Trichomteile, Haarzellen) auf.

In überalterten Kulturen (Erddekokt, Aqua dest.) konnten bei *Anabaena* und *Cylindrospermum*-Arten — Vertreter, die normalerweise frei von Vacuolen sind — Vacuolen hervorgerufen werden. Auch in diesen Fällen hing die Vacuolisation mit der Zellalterung zusammen.

Es handelt sich um echte, dünnflüssige Vacuolen mit BROWNScher Molekularbewegung im Innern.

3. Zwischen Zentralsubstanz und Vacuolenbildung wurde folgender Zusammenhang beobachtet: Die Zentralsubstanz lag entweder der Vacuole mütenförmig an oder in Form einzelner Partikelchen um sie herum. In alten Zellen waren teilweise nur noch Vacuolen, aber keine Zentralsubstanz mehr zu erkennen. Die Zentralsubstanz scheint aus dem Gel- in den Solzustand übergehen und so Vacuolen bilden zu können.

4. Durch die Quellungsfähigkeit der Zentralsubstanz wird in teilungsfähigen Zellen der Turgor bedingt; in der vacuolisierten Zelle hängt er weitgehend von der Vacuole ab. Das Plasmolyseverhalten

¹ Vgl. die meristematische Teilung der *Oscillatorien* nach FRESETUS, 1845.

der vacuolisierten Blaualgenzelle entspricht im wesentlichen dem einer höheren Pflanzenzelle.

5. Die Metachromatinkörner scheinen Zentralsubstanzpartikel — zum Teil denaturiert — zu sein.

6. Die Cyanophycinkörner — stark lichtbrechende Einschlüsse in alten Zellen (z. B. Dauerzellen) — in denen sich keine Nucleinsäure nachweisen ließ, färbten sich intensiv mit Trypaflavin, das nach Angaben früherer Autoren nucleinsäurehaltige Strukturen angreifen soll. Diese Unstimmigkeit kann darauf beruhen, daß die Proteine bei der Färbung eine größere Rolle spielen als bisher nachgewiesen werden konnte.

7. Die normale Blaualgenzelle ist als eine Zelle anzusehen, die stets im meristematischen Zustand verbleibt; erst bei ihrer Alterung, die häufig nur durch Außenfaktoren bedingt werden kann, treten auch Alterserscheinungen auf.

8. Die cytologischen Verhältnisse bei *Beggiatoa* konnten noch nicht restlos geklärt werden. Es ist anzunehmen, daß *Beggiatoa*-Zellen frühzeitiger als *Oscillatorien*-Zellen altern.

9. Zu den Untersuchungen wurden 27 Arten verwendet.

Für Stellung des Themas und Förderung der Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. R. HARDER herzlich danken.

Literatur.

BARY, A. DE: Beitrag zur Kenntnis der Nostocaceen, insbesondere der Rivularien. Flora. N. Reihe **21**, 553 (1863). — BAUCH, R.: Trypaflavin als Typus der Chromosomengifte. Naturwiss. **34**, 346 (1947); Irreversible Chromosomenschädigung durch Trypaflavin. Planta **35**, 536 (1948); Selektive Speicherung von Trypaflavin durch die Nukleoproteide der Chromosomen. Biol. Zbl. **68**, 113 (1949). — BAUMGÄRTEL, O.: Das Problem der Cyanophyceenzelle. Arch. f. Protistenk. **41**, 50 (1920). — BECKER, W. A., u. L. BECKEROWA: Zur Frage der Vitalfärbung der Meerescyanophyteen. Cellul. **45**, 337 (1937). — BERG, W.: Was haben die chemischen Methoden einerseits, die mikroskopischen Methoden andererseits bei der Beantwortung der Frage nach der Eiweißspeicherung in der Leber geleistet? Z. mikr. anat. Forsch. **12**, 1 (1927). — BOGEN, H. J.: Anfärbung, Schädigung und Abtötung von Hefezellen durch Acridinorange. Arch. f. Mikrobiol. **18**, 170 (1953). — BRACHET, J.: La détection histo-chémique des acides pentosenucléiques. C. r. Soc. Biol. Paris **133**, 88 (1940); La localisation des acides pentosenucléiques pendant le développement des amphibiens. Ebenda **90**; La détection histo-chémique et le microdosage des acides pentosenucléiques. Enzymologia (Haag) **10**, 87 (1941); La localisation des acides pentosenucléiques dans les tissus animaux et les œufs d'amphibiens en voie de développement. Arch. de Biol. **153**, 207 (1942). — BRANDT, K.: Physiologische Chemie und Cytologie der Preßhefe, Protoplasma (Berl.) **36**, 77 (1941). — BRINGMANN, G.: Vergleichende Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Oscillatorien. Planta (Berl.) **38**, 541 (1950); Über Beziehungen der Kernäquivalente von Schizophyten zu den Mitochondrien höher organisierter Zellen. Ebenda **40**, 398 (1952). — BÜTSCHLI, O.: Weitere Ausführungen über den Bau von Cyanophyceen und Bakterien. Leipzig 1896.

CASPERSSON, T.: Studien über den Eiweißumsatz der Zelle. *Naturwiss.* **29**, 33 (1941). — CASPERSSON, T., u. K. BRANDT: Nukleotidumsatz und Wachstum bei Preßhefe. *Protoplasma* (Berl.) **35**, 507 (1941). — CASPERSSON, T., u. B. THORELL: Der endozelluläre Eiweiß- und Nukleinsäurestoffwechsel in embryonalem Gewebe. *Chromosoma* **2**, 132 (1941). — CHOLNOKY, B. J. v.: Zur Kenntnis der Cyanophyceenzelle. *Protoplasma* (Berl.) **28**, 524 (1937). — CERUTI, A.: Sulle strutture protoplasmatiche in rapporto ad alcune soluzioni. *Protoplasma* (Berl.) **39**, 79 (1949). — CUNHA, A. DE: Sur la signification du corps central des Cyanophycées. *C. r. Soc. Biol.* **118**, 1122 (1935).

DANGEARD, P. A.: Observations sur le vacuome des Cyanophycées. *C. r. Acad. Sci. Paris* **197**, 1016 (1933). — DELAPORTE, B.: Recherches cytologiques sur les Bactéries et les Cyanophycées. *Rev. gén. Bot.* **51/52** (1940). — DELAPORTE, B., u. N. ROUKHELMANN: Sur la présence de la thymine dans l'acide nucléique extrait de la levure. *C. r. Acad. Paris* **206**, 1399 (1938). — DRAWERT, H.: Über die Aufnahme und Speicherung von Prune pure durch die pflanzliche Zelle. *Planta* (Berl.) **29**, 179 (1939); Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen. I. Mitteilung: Literaturübersicht und Versuche mit *Oscillatoria* Borneti Zukal. *Ebenda* **37**, 161 (1949). — DUGHI, R.: Metachromatine et pseudovacuoles des Cyanophycées. *C. r. Acad. Sci. Paris* **228**, 1245 (1949); Contribution à l'étude des inclusions cellulaires des Cyanophycées. *Rev. gén. Bot.* **53**, 412, 461, 510 (1946).

FISCHER, A.: Untersuchungen über den Bau der Cyanophyceen und Bakterien. Jena 1897. — FRESENIUS, G.: Über den Bau und das Leben der Oscillatorien. *Museum Senckenbergianum*, Bd. III, 265 (1845). — FREY-WYSSLING, A.: Submikroskopische Morphologie des Plasmas und seiner Derivate. *Bornträger* Berlin (1938). — FRITSCH, F. E.: The heterocyst, a botanical enigma. *Proc. Linnean, Soc. London* **162**, 194 (1951).

GAVAUDAN, P., u. N. GAVAUDAN: Quelques remarques sur la cytologie des Oscillatoriées. *Bull. soc. bot. France* **80**, 706 (1933). — GEITLER, L.: Kleine Mitteilung über Blaualgen. *Öst. Bot. Ztschr.* **70**, 158 (1921); Zur Cytologie der Blaualgen. Eine Kritik der Arbeit O. BAUMGÄRTELS: Das Problem der Cyanophyceenzelle. *Arch. f. Protistenk.* **45**, 413 (1922); Cyanophyceen. RABENHORSTS Kryptogamenflora. Leipzig 1932; Schizophyceen (in *Handbuch der Pflanzenanatomie* LINSBAUER 1926) Berlin 1936. — GICKLHORN, J.: Plasmolyse-Orte verschiedener Entwicklungsstadien einer Zelle. *Protoplasma* (Berl.) **12**, 79 (1931). — GLICK, D.: *Techniques of Histo- and Cytochemistry*. Interscience publishers INC. New York 1949. — GORBUNOVA, N. P.: Beobachtungen zur Cytologie und Entwicklungsgeschichte einiger Cyanophyceen. *Bull. Soc. Naturalistes Moscou, Sér. Biol.* **55**, H. 3, 70 (1950). — GÖSSNER, W.: Zur Histochemie des STRUGGER-Effektes. *Verh. d. D. Ges. f. Pathol.* **33** (Tg. Kiel), 102 (1949). — GUILLIERMOND, A.: Contribution à l'étude cytologique des Cyanophycées. *Rev. gén. Bot.* **18**, 392 (1906); Nouvelles recherches sur la structure des Cyanophycées. *Ebenda* **38**, 129 (1926); Sur la structure des Beggiatoa. *C. r. Soc. Biol.* **94**, 579 (1926); Le vacuome des cellules végétales. *Protoplasma* (Berl.) (1930); La structure des Cyanophycées. *C. r. Acad. Sci.* **197**, 182 (1933); Les constituants morphologiques du cytoplasma. III. Le système vacuolaire ou vacuom. Hermann u. Cie., Paris (1934).

HAMMARSTEN, E., G. HAMMARSTEN u. T. TEORELL: Versuche über mikrochemische Reaktionen. *Acta Med. Scandinavica* **68**, 219 (1928). — HIERONYMUS, G.: Beiträge zur Morphologie und Biologie der Algen. *Cohns Beiträge z. Biol. d. Pfl.* **5**, 461 (1892). — HINZE, E.: Beggiatoa. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **19**, 369 (1901). — HÖFLER, K., A. TOTH u. M. LUHAN: Beruht die Fluorochromfärbung von Zellkernen auf Elektroabsorption an der Eiweißphase? *Protoplasma* (Berl.) **39**, 62 (1949).

KAUFMANN, B. P., M. R. McDONALD u. H. GAY: The distribution and interaction of nucleic acids in fixed cells as shown by enzymatic hydrolyses. *J. cellul. comp. Physiol.* **38**, 71 (1951). — KOHL, F.: Über die Organisation und Physiologie der Cyanophyceenzelle und die mitotische Teilung ihres Kerns. Jena 1903. — KRUKOW, M. G.: Die Rolle der Nukleinsäuren bei den biologischen Formbildungsprozessen. *Nachr. d. Ak. d. W. der UdSSR, Biol. Serie* Nr. **5**, 110 (1950); Übersetzung aus: Über die Entstehung von Zellen. Drei Arbeiten aus dem Laboratorium von O. B. LEFESCHINSKAJA, 12. Beiheft zur „Sowjetwissenschaft“, Verlag Kultur und Fortschritt, Berl. 1951. — KUCHAR, K.: Plasmolyseformverlauf und Trichomzerfall bei zwei Oscillatorien. *Phyton* **2**, 213 (1950). — KURNICK, N. B.: Methylgreen-Pyronin I (Basis of selectiv staining). *J. gen. Physiol.* **33**, 243 (1950). — KÜSTER, E.: Botanische Betrachtungen über Alter und Tod. *SCHAXELS Abh. z. theoret. Biologie.* Heft **10**, 44 S. (1921); Die Pflanzenzelle, Jena 1935.

LEHNARTZ, E.: Einführung in die chemische Physiologie. Springer Berlin u. Heidelberg (1948). — LEPECHKIN, W.: Kolloidchemie des Protoplasmas. 2. Aufl. Dresden und Leipzig 1938. — LETTRÉ, H., u. R. LETTRÉ: Aufhebung der Wirkung von Mitosegiften durch chemische Faktoren. *Naturwiss.* **33**, 283 (1946).

MACALLUM, A.: On the cytology of non-nucleated organisms. *Trans. Canad. Inst.* **6**, 439 (1899). — MCILWAIN, H.: A nutritional investigation of the antibacterial action of acriflavine. *Biochemic. J.* **35**, 1311 (1941). — METZNER, H.: Cytochemische Untersuchungen über das Vorkommen von Nukleinsäuren in Chloroplasten. *Biol. Zbl.* **71**, 257 (1952). — MEYER, A.: Orientierende Untersuchungen über Verbreitung und Chemie des Volutins. *Bot. Ztg.* **LXII**, 113 (1904). — MIGULA, W.: Über den Einfluß von stark verdünnter Säurelösung auf Algenzellen. *Diss.* Breslau 39 S. (1888). — MILOVIDOV, P. F.: Zur Theorie und Technik der Nuklealfärbung. *Protoplasma* (Berl.) **25**, 570 (1936). — MÜHLDORF, A.: Das plasmatische Wesen der pflanzlichen Zellbrücken. *Beih. Bot. Cbl.* **56**, Abt. A, 171 (1937); Beiträge zur Frage über das Vorkommen von Zellbrücken bei den Cyanophyceen und Rhodophyceen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **56**, 16 (1938); Einige Betrachtungen zur Membranmorphologie der Blaualgen. *Ebenda* 316 (1938).

NEUGNOT, D.: Contribution à l'étude cytochimique des Cyanophycées par application des techniques de mise en évidence de l'appareil nucléaire chez les Bactéries. *C. r. Acad. Sci. Paris* **230**, 1312 (1950). — NEUMANN, F.: Die Frage nach dem Kern der Bakterien und ihre Beantwortung mit Hilfe der Nuklealfärbung. *Berl. tierärztl. Wschr.* **46**, 101 (1930).

ORTMANN, R.: Über Kernsekretion, Kolloid und Vakuolenbildung in Beziehung zum Nukleinsäuregehalt in Trophoblasten-Riesenzellen der menschlichen Plazenta. *Z. Zellforsch.* **34**, 562 (1949).

PALLA, E.: Beiträge zur Kenntnis der Baues des Cyanophyceenprotoplasten. *Jahrb. Wiss. Bot.* **25**, 511 (1893). — POLLISTER, A. W., u. C. LEUCHTENBERGER: The nature of the specificity of Methylgreen for Chromatin. *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **35**, 111 (1949). — PLOTHO, O. v.: Die chromatische Substanz bei Actinomyceten. *Arch. Mikrobiol.* **11**, 285 (1940). — POLJANSKY, G., u. G. PETRUSCHEWSKY: Zur Frage über die Struktur der Cyanophyceenzelle. *Arch. f. Protistenk.* **67**, 11 (1929). — PRÁT, S.: Beitrag zur Kenntnis der Organisation der Cyanophyceenzelle; *Arch. f. Protistenk.* **52**, 142 (1925). — PRINGSHEIM, E. G.: The relationship between Bacteria and Myxophyceae. *Bacteriological Reviews* **13**, 47 (1949).

RESÜHR, B.: Hydratations- und Permeabilitätsstudien an unbefruchteten Fucus-Eiern. *Protoplasma* (Berl.) **24**, 531 (1936). — RIPPPEL-BALDES, A.: Fortschritte aus dem Gebiet der Morphologie und Ökologie der Mikroorganismen. *Zbl. f. Bacteriol.* **154**, Abt. I, 175 (1949); *Grundriß der Mikrobiologie*. 2. Aufl. Berlin, Göttingen,

Heidelberg. 1952. — RUGE, U.: Übungen zur Wachstums- und Entwicklungsphysiologie der Pflanze. Berlin, Göttingen, Heidelberg 1951. — ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. 15. Aufl. München 1948.

SCHÖNLEBER, K.: Beiträge zur normalen und pathologischen Cytologie und Cytogenese der Blaualgen. Arch. f. Protistenk. 88, 36 (1936); Über die Vitalfärbung der Cyanophyceen. Cytopathologische Beobachtungen an einer epiphyllen Form. Z. Mikrosk. 54, 204 (1937). — SCHWENDENER, S.: Zur Wachstumsgeschichte der Rivularien. Sitzbr. Acad. Wiss. Bln. phys. math. Kl. 38 (1894). — STICH, H.: Über das Vorkommen von Ribonukleinsäure in Kernsaft und Spindel sich teilender Kerne von *Cyclops strenuus*. Z. Naturforsch. Bd. 6b, 259 (1951). — STEINECKE, F.: Das Auskeimen alter Heterocysten bei *Calothrix Weberi*. Bot. Archiv 34, 153 (1932). — STROH, L.: Über prämortale Maseration bei Oscillatorien. Arch. f. Protistenk. 91, 187 (1938). — STRUGGER, S.: Die Vitalfärbung der Chromosomen. Dtsch. tierärztliche Wschr. 48, 645 (1940); Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Berlin, Göttingen, Heidelberg 1949; Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover 1949.

TISCHLER, G.: Allgemeine Pflanzenkaryologie. I. Der „Ruhekern“. Aus: LINSBAUER, Handbuch der Pflanzenanatomie. Bornträger, Berlin 1934.

VENDRELY-RANDAVEL, C.: Substitution de l'acide chlorhydrique à la ribonucléase pour l'étude de la localisation de l'acide ribonucléique au sein des cellules animales. C. r. Soc. Biol. Paris 143, 249 (1949).

WADA, B.: Experimentelle Untersuchungen lebender Zellen in der Teilung. I. Die Einwirkung des Chloroform- und Ätherdampfes auf die Mitose bei den Tradescantia-Haarzellen. Cytologia 9, 97 (1938). — WAGNER-JAUREGG, TH.: Die Acridinsalze der Adenosinpolyphosphorsäure. Z. physiol. Chem. 239, 188 (1936); Die neueren biochemischen Erkenntnisse und Probleme der Chemotherapie. Naturwiss. 31, 335 (1943).

ZACHARIAS, E.: Über die Zellen der Cyanophyceen. Bot. Ztg. 48, 2 (1890). — ZEIGER, K., H. HARDERS u. W. MÜLLER: Der STRUGGER-Effekt an der Nervenzelle. Protoplasma (Wien) 40, 76 (1951). — ZUKAL, H.: Neue Beobachtungen über einige Cyanophyceen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 19, 256 (1894).

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut in Göttingen.)

Untersuchungen über die Ernährung einiger Myxobakterien*.

Von

HELGA OETKER.

Mit 16 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Mai 1953.)

Die älteren Arbeiten über die Myxobakterien beschreiben einzelne Vertreter dieser damals noch wenig bekannten Organismengruppe, ihre Ergebnisse sind bei JAHN (1924) zusammengefaßt; die neueren Untersuchungen beschäftigen sich hauptsächlich mit bestimmten physiologischen Problemen. Neben cytologischen, entwicklungs- und bewegungsphysiologischen Arbeiten (KRZEMIENIEWSKI 1928, BADIAN 1930, 1933, MILOVIDOV 1935, BEEBE 1941, STANIER 1942, KLIENEBERGER-NOBEL 1945, 1947, PIEKARSKI 1949, MEYER-PIETSCHMANN 1951) gibt es auch mehrere Untersuchungen über vorwiegend ernährungsphysiologische Fragen, die sich mit der Brauchbarkeit einiger C- und N-Quellen (KRZEMIENIEWSKI 1937, SOLNTZEWA 1941, BEEBE 1943, KÜHLWEIN 1950, FINCK 1951) und Wirkstoffe (FINCK 1951) für die Myxobakterien befassen. Ein Vergleich der Ergebnisse untereinander und mit gelegentlichen Beobachtungen der älteren Autoren (BAUR 1905, QUEHL 1906, VAHLE 1909, JAHN 1936) zeigt deutliche Widersprüche, besonders bezüglich der Verwertbarkeit niedermolekularer C- und N-Verbindungen.

Es gibt aber noch einen ganz anderen Gesichtspunkt für die Betrachtung der Ernährungsphysiologie der Myxobakterien: ihre Beziehung zu anderen Bakterien. Schon ältere Autoren (BAUR 1905, JAHN 1915, PINOY 1921) hatten einen Einfluß anderer Mikroorganismen auf die Myxobakterien festgestellt, später wies KÜHLWEIN (1950) eine symbiontische, vielleicht auch symbiontisch-parasitische Beziehung eines Myxobakteriums zu Amöben, FINCK (1951) die bakteriostatische bzw. bactericide Wirkung der *Myrococcaceen* nach, aber nur SOLNTZEWA (1939, 1941), SNIESKO, McALLISTER und HITCHNER (1941, 1942), BEEBE (1941/42) und IMSENECKI (1951) beobachteten eine Lysis von Fremdbakterien durch Myxobakterien und erkannten einen Zusammenhang dieser Erscheinung mit der Ernährung der Myxobakterien. Die umfassendste, in Deutschland aber zunächst unbekannt gebliebene Aufklärung der Verhältnisse ist durch OXFORD und SINGH (1946) und SINGH (1947) erfolgt, die nachwiesen, daß die Myxobakterien sich auch allein mit lebendem (aber auch mit abgetötetem) Bakterienfutter gut entwickeln können. Die Fremdbakterien werden durch ein Antibiotikum getötet (dessen Rohdarstellung bereits gelang) und durch proteolytische Fermente gelöst.

Läßt man die Widersprüche außer Acht, so kann man in großen Zügen aus der zitierten Literatur folgern: Für die Myxobakterien sind verwertbar als C-Quellen: Mono-, Di- und Polysaccharide, ferner der C-Gehalt organischer Stickstoffverbindungen; als N-Quellen: Mineralischer Stickstoff, Aminosäuren, Pepton und die

* Dissertation der Mathem.-Naturwiss. Fakultät der Universität Göttingen.

Eiweiße der Bakterienzelle. Ob eine so große Spanne ausnutzbarer Nahrungsquellen tatsächlich gegeben ist, ob sie für alle Myxobakterien zutrifft oder ob die morphologisch definierten Arten in Rassen mit verschiedenen physiologischen Fähigkeiten zerfallen, kann wohl erst durch zahlreiche Versuche geklärt werden.

In den nachstehenden Untersuchungen soll daher ein weiterer Beitrag zur Frage nach der Wirkung verschiedener C- und N-Quellen sowie mehrerer Wirkstoffe auf das Gedeihen einiger Myxobakterien-Stämme gebracht werden. Außerdem beschäftigen sie sich auch mit der Ernährung der Myxobakterien durch Futterorganismen. Die SINGHschen Untersuchungen sind nur mit *Myxococcaceen* durchgeführt worden, in den folgenden Versuchen wurde auch eine *Polyangiacee* auf ihre bakteriolytischen Fähigkeiten geprüft. Da SINGH als Futter eine Reihe von Bakterienstämmen verwendet hat, war es wünschenswert, das Verhalten der Myxobakterien nicht nur gegen diese, sondern auch gegen andere Mikroorganismengruppen, die am natürlichen Standort der Myxobakterien vorkommen können, zu untersuchen; deshalb wurden auch Fütterungsversuche mit einigen Pilzen und Algen angestellt.

A. Experimenteller Teil.

I. Versuchsmaterial, Vorversuche, Versuchsbedingungen.

I. Gewinnung der Rohkulturen.

Zur Gewinnung der Rohkulturen wurden mit sterilisierten Wildmisten belegte Bodenproben aus verschiedenen Teilen Deutschlands gut angefeuchtet in PETRISCHALEN ausgebreitet (vgl. JAHN 1924, 1936, KRZEMIENIEWSKI 1926, 1927, 1928, 1930). Nach einigen Wochen — bei Aufbewahrung im Dunkeln und bei zahlreichen Ansätzen — traten die Fruchtkörper von *Myxococcus fulvus*, *Myxococcus virescens*, *Chondrococcus coralloides* und *Polyangium fuscum* mehrfach, von *Myxococcus stipitatus* und *Podangium erectum* sowie einer *Sorangium*- und einer *Archangium*-Art je einmal auf. Mit Ausnahme der letztgenannten beiden Arten konnten alle Formen weiterkultiviert werden.

Wesentlich bessere Erfolge ergab das Verfahren mit Futterbakterien als Köder (SINGH 1947, NORÉN 1951), bei dem die zu untersuchenden Bodenproben auf nährstofffreien Agar mit einem Ausstrich geeigneter Futterbakterien gestreut werden. Mit dieser Methode — mit *Escherichia coli* als Futter — ließen sich z. B. bei mehreren Stichproben im Frühjahr 1952 *Myxococcus fulvus*, *Myxococcus virescens* und *Chondrococcus coralloides* schon in kleinsten Bodenkrümeln aus dem Göttinger Botanischen Garten leicht nachweisen.

Für die nachstehenden Versuche wurden *Myxococcus fulvus*, *Myxococcus virescens*, *Myxococcus stipitatus* und *Podangium erectum* benutzt; diese Arten wurden rein kultiviert.

2. Gewinnung und Erhaltung von Reinkulturen.

Über die Herstellung reiner Myxobakterien-Kulturen gibt es nur wenige Literaturangaben: Nach VAHLE (1909), JAHN (1936), KRZEMIENIEWSKI (1937) und SOLN-TZEWA (1941) soll wiederholtes Abimpfen der äußersten Spitzen des vegetativen Schwarmes auf geeignete Böden zu Reinkulturen führen. Die übliche Reinzüchtung mit dem Kochschen Schüttelplattenverfahren halten die meisten Beobachter nicht.

für möglich, da sie keine Sporenkeimung im Agar erreichen konnten, aber SINGH (1947) glückte diese Methode doch. Über Versuche zur Isolierung mit dem Mikromanipulator finden sich Angaben bei MEYER-PIETSMANN (1951).

Zur Gewinnung absoluter Reinkulturen von Myxobakterien müssen zwei Bedingungen erfüllt sein: Alle Begleitorganismen müssen entfernt werden, was wegen ihres Festhaftens im Schleim der Myxobakterien sehr schwierig ist, und außerdem muß der verwendete Nährboden so beschaffen sein, daß die Reinkulturen auf ihm gut wachsen.

a) Beseitigung der Begleitorganismen.

Versuche, Reinkulturen durch wiederholtes Abimpfen der Schwarmspitzen, durch Flächenausstriche, durch äußere Sterilisation der festen *Podangium*-Cysten (mit H_2O_2 , Alkohol und Chlorkalk in verschiedenen Konzentrationen und bei verschiedenen Anwendungszeiten) zu erreichen, mißlangen. Auch das KOCHsche Plattenverfahren führte nicht sofort zu reinen Kulturen, da eine Isolierung der durch Schleim zusammenhaftenden Myxobakteriensporen und Fremdorganismen durch einfaches Schütteln in Wasser nicht möglich war.

Erst als eine größere Menge von Fruchtkörpern mit feinem Quarzmehl in einer Reibschale gründlich zerrieben und dann mit sterilem aq. bidest. aufgenommen und geschüttelt wurde, glückte die Isolierung. Von den Sporen überstanden zwar nicht alle die grobe Behandlung, aber einige keimten im Agar zu sehr kleinen Kolonien aus. Bei den untersuchten Arten sehen sie alle sehr ähnlich aus: rund, mit stacheligem Rand. Sie zu erkennen und abzuimpfen, ist wegen der dazwischenliegenden Fremdbakterien-Kolonien etwas schwierig, aber durchaus möglich. Vorsichtshalber wurden die Fruchtkörper der so erhaltenen Kulturen nochmals der gleichen Methode unterworfen.

b) Brauchbare Substrate für die Kulturen nach Beseitigung der Begleitorganismen.

Parallel mit der Entfernung der Begleitorganismen liefen Versuche, geeignete Substrate für die allmählich reiner werdenden Myxobakterien-Kulturen zu finden. Rohkulturen wachsen und fruktifizieren auf vielen Nährböden, weil fast immer ein Teil der Begleitorganismen, die sich auf diesen Substraten vermehren, als Futter für die Myxobakterien brauchbar ist, während Reinkulturen ihr Nährstoffbedürfnis allein aus dem Boden decken müssen; es gibt aber nur wenige Medien, die ihnen eine vollständige Entwicklung mit guter Fruktifikation gestatten.

Die Rolle der Begleitorganismen für die Entwicklung der Myxobakterien zeigte sich übrigens deutlich am Rückgang der Fruchtkörperbildung mit zunehmendem Reinheitsgrad der Myxobakterienkulturen, als zufällig eine Zeitlang ein für Reinkulturen sehr ungünstiger Rehmist-Agar benutzt wurde (Tab. 1).

Als am geeignetsten zur Haltung von Reinkulturen erwiesen sich Agarplatten (2%), die — entsprechend SINGH (1947) — als einzige Nahrungsquelle abgetötetes Bakterienfutter enthielten. Solche Bakterienfutterböden wurden später ausschließlich zur Gewinnung von

Reinkulturen verwendet. Dazu wurden in mehreren Vorversuchen *Myxococcus fulvus*, *M. virescens*, *M. stipitatus* und *Podangium erectum* (die damals alle in noch nicht völlig reinen Kulturen vorlagen) mit einer Reihe von lebenden Bakterien gefüttert, indem auf einer 2% igen Agar-gallerte (+ 0,5% NaCl) ein dicker Ausstrich der Futterbakterien hergestellt und mit einem Myxobakterien-Fruchtkörper zentral beimpft wurde. Dadurch konnten für Reinzuchtböden brauchbare Futterbakterien erkannt werden; als am besten geeignet erwiesen sich von allen geprüften verwertbaren Organismen *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus*. Später wurde dann auch die Frage nach der günstigsten Konzentration der Futterbakterien im Nährmedium untersucht; am besten wirkten 0,10—0,15 g Trockengewicht je 100 cm³, das ist etwas mehr, als bei BEEBE (1941) angegeben ist (0,05 g je 100 cm³).

Tabelle 1. Rückgang der Fruktifikation bei *Myxococcus fulvus* auf Rehmist-Agar (2% Rehmistdekot, 2% Agar, pH = 6,5 bis 7,5) bei allmählicher Reinigung.

Impfserie.	1	2	3	4	5	6	7
Anteil der fruktifizierenden Kulturen, 3 Wochen nach der Impfung, in % . . .	100	100	80	71	64	58	38

Herstellung der Bakterienfutter-Böden mit *Staphylococcus aureus* oder *Escherichia coli*. Die Futterbakterien wurden drei Tage im Flächenausstrich auf Probacit-Agar (1% Probacit, 1% Glucose, 1% Pepton, 2,3% Agar, pH = 7) bei 25° C angezogen. Für 500 cm³ Nährboden war die Bakterienmasse von ungefähr 20 PETRI-Schalen erforderlich. Die Bakterien wurden mit einem Nickelspatel ohne Verletzung des Agars vorsichtig abgeschabt und in 500 cm³ physiologischer NaCl-Lösung suspendiert. Dann wurden 2% Agar zugefügt und dreimal im Dampftopf sterilisiert. Eine Prüfung des pH-Wertes mit Bromthymolblau nach dem ersten Sterilisieren ergab in allen Fällen 6,5—7. Wurde zum Suspendieren statt physiologischer NaCl-Lösung ein 2% iger Kartoffeldekot (Kartoffelreißel 30 min in aq. bidest. gekocht) genommen, so ergab sich für *Podangium erectum* eine noch bessere Entwicklung. Es zeigte sich aber in mehreren Fällen, daß diese Futterböden nur frisch gut verwertbar sind.

Die Myxobakterien-Reinkulturen blieben in vielen Passagen auf Bakterienfutter-Böden erhalten, ohne daß ein Rückgang in der Entwicklung eintrat.

Auf *Coli*- und *Staphylococcus aureus*-Böden mit und ohne Kartoffeldekotzusatz wuchsen und fruktifizierten *Myxococcus fulvus* und *M. virescens* gut, *M. stipitatus* entwickelte sich vegetativ gut, fruktifizierte aber nur schwach, *Podangium erectum* wuchs bei Kartoffeldekotzusatz üppig; es bildete jedoch auf *Coli*-Böden nur Fruchtkörperanlagen aus und auf *Staphylococcus aureus*-Böden + Kartoffeldekotzusatz immer nur wenige normale Fruchtkörper. Bei allen Myxobakterien konnte allerdings mit totem Futter niemals eine vegetativ und fruktifikativ so üppige Entwicklung erhalten werden wie mit gleichem lebenden Futter.

Während man die antibiotische Wirkung der Myxobakterien (d. h. die Tötung der Fremdorganismen) immer nur im Bereich des vegetativen Schwarmes bemerkt, kann man auf Bakterienfutterböden (ohne Kartoffeldekotzusatz) sehr gut eine Diffusion des proteolytischen Fermentsystems erkennen, die besonders bei dem *Coli*-Boden deutlich ist. Um die sich ausbreitenden vegetativen Schwärme der *Myxococcus*-Arten sieht man zwei konzentrische Klärungshöfe, von denen der innere ganz klar ist und der äußere in einer gleichmäßigen, aber nicht vollständigen Klärung erscheint. Dagegen erkennt man bei *Podangium erectum* nur einen Klärungshof, der allmählich in den unbeeinflussten Agar übergeht, wie es bei gleichmäßiger Diffusion eines lytischen Fermentes nach allen Richtungen vom Schwarm aus zu erwarten ist. Die Erscheinung bei den *Myxococcus*-Arten legt den Gedanken an zwei diffundierende Systeme mit verschiedenen Diffusionsgeschwindigkeiten nahe.

Neben den Bakterienfutter-Böden wurden verschiedene andere natürliche Substrate zur Erhaltung von Reinkulturen geprüft, wobei die Ergebnisse nur kurz wiedergegeben werden sollen, da sie ja wegen der unkontrollierbaren und schwankenden Zusammensetzung der Nährböden kein allgemeines Interesse haben können.

Verschiedene Mistdekote (Rotwild-, Hasen-, Kaninchenmist) + 2% Agar hatten je nach Art und Herkunft schwache bis gute Wirkung auf Wachstum und Fruchtkörperbildung. Wahrscheinlich hängt diese Wirkung vor allem vom Bakterienreichtum des Mistes ab, denn eine Filtration der Dekote durch bakteriendichte Membranfilter führte zu nicht verwertbaren Böden. Bäckerhefe und Erddekote + 2% Agar ergaben in verschiedenen Konzentrationen nur gute vegetative Entwicklung bei allen geprüften Arten, während Kartoffeldekot (5% Kartoffelreißel) + 2% Agar bei den *Myxococcus*-Arten schwaches Wachstum und geringe Fruktifikation, bei *Podangium erectum* gutes Wachstum und schwache, aber vollkommene Fruchtkörperbildung hervorrief. Dabei ließ sich mit LUGOLscher Lösung die verschiedenen gute Stärkehydrolyse durch die Myxobakterien nachweisen: *Podangium erectum* baut die Stärke weit über den Schwarmbereich hinaus ab, die *Myxococcus*-Arten lösen sie nur im Schwarmgebiet, *Myxococcus fulvus* am stärksten, *M. virescens* und *M. stipitatus* nur schwach. Als sehr gut erwiesen sich Mischungen von Mist- und Kartoffeldekoten. Auf Probacit-Agar und Malz-Agar (3% Biomalz, 2% Agar, p_H auf 6,5—7 eingestellt) trat bei den *Myxococcus*-Arten nur vegetatives Wachstum ein, während *Podangium erectum* sich nicht entwickelte.

3. Die Versuchsbedingungen.

Substrat: Alle Versuche wurden auf 2% igem Agar (in über Quarz destilliertem Wasser) gemacht.

Bei der Beurteilung der Verwertbarkeit eines agarhaltigen Nährbodens für die Myxobakterien wurde eine (an sich längst bekannte) Erscheinung im Gegensatz zu

früheren ernährungsphysiologischen Arbeiten (KÜHLWEIN 1950, FINCK 1951) besonders beachtet, nämlich daß sich viele Myxobakterien bereits auf reinem Agar schwach entwickeln. Es wurden daher bei der Beimpfung eines Nährbodens stets Kontrollkulturen auf reinem Agar angelegt. Aus gewissen Beobachtungen darf geschlossen werden, daß diese Entwicklung nicht auf einem geringfügigen Abbau des Agars beruht, sondern durch die Reservestoffe der aufgeimpften Sporen oder Stäbchen ermöglicht wird¹. Für alle Versuche wurde ein sehr eiweißarmer Agar benutzt (Stangenagar von Merck, Lieferung 1928). Je nach der Vorbehandlung hatte er folgenden N-Gehalt (KJELDAHL-Bestimmungen), bezogen aufs Trockengewicht:

1. 14 Tage gründlich ausgefault: 0,10%, 2. 2 Tage in Leitungswasser, 1 Tag in aqua dest. gewässert: 0,14%, 3. unvorbehandelt: 0,22%. Das entspricht bei der Annahme, daß es sich nur um in Proteinen gebundenen Stickstoff handelt, einem Eiweißgehalt von ungefähr 0,6% bei 1., 0,9% bei 2., 1,4% bei 3. Da der Unterschied zwischen ausgefaultem und gewässertem Agar nicht sehr groß ist, wurde für alle Versuche der gewässerte Agar benutzt.

Temperatur: Sämtliche Kulturen (auch die Anzuchten der Futterorganismen) wurden in Thermostaten bei 25° C gehalten. Einige Versuche bei 28° und 33° zeigten wohl Einflüsse auf die Pigmentierung und geringe Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit, aber keine Wirkung auf die Entwicklungsstärke.

Der pH-Wert aller benutzten Kultursubstrate wurde mit Bromthymolblau auf 6,5—7 eingestellt, da die untersuchten Arten sich bei neutraler Reaktion gut entwickeln konnten.

Das Myxobakterien-Impfmateri al wurde für alle Versuche 10 Tage auf Böden mit totem Bakterienfutter herangezogen, die *Myxococcus*-Arten auf *Coli*-Agar, *Podangium erectum* auf *Staphylococcus aureus*-Kartoffeldekot-Agar. Zur Beimpfung der Versuchskulturen wurden nur Fruchtkörper verwendet.

Die Anzucht der Futterorganismen für die Versuche mit lebendem Futter erfolgte in PETRI-Schalen im Flächenausstrich. Die Bakterien wurden auf Probacit-Agar (Ausnahme *Bacterium radicolica* auf Spezialboden), die Hefen auf Malzextrakt-Agar 3 Tage kultiviert, *Phlyctochytrium spec.* dagegen 10 Tage auf Pepton-Malz-Agar (0,25% Pepton, 2% Biomalz, 1,5% Agar, pH 6—6,5). Die Algen wurden 4 Wochen auf KNOP-Agar bei diffusum Tageslicht bei 18—22° C angezogen. Alle Futterorganismen ließen sich mit der Impföse leicht vom Nährboden abheben.

Die Registrierung erfolgte bei allen Versuchen nach 10 Tagen, bei einigen kam noch eine weitere nach 5 Tagen hinzu.

Alle Versuche wurden in mehreren parallelen Serien angelegt. Methodische Einzelheiten, die bei den Versuchen jeweils verschieden waren, sollen kurz bei der Beschreibung der Versuche mit erwähnt werden.

4. Die Bewertung der Kulturen.

Zur Beurteilung der Entwicklung wurde nach den Erfahrungen an den Stammkulturen und an Vorversuchen ein Bewertungsschema aufgestellt, das die vegetative Entwicklung und die Fruktifikation getrennt quantitativ und qualitativ zu erfassen sucht².

¹ Damit der Einfluß der Herkunft des Impfmateri als nicht die Beurteilung eines Nährbodens beeinträchtigen konnte, wurden die Versuchs- und die zugehörigen Kontrollkulturen stets mit Material derselben Herkunft beimpft.

² Beide Erscheinungen hängen zwar zusammen, indem eine gute Fruktifikation eine gute vegetative Entwicklung voraussetzt, aber letztere führt nicht zwangsläufig auch zu einer kräftigen Fruktifikation.

Vegetative Entwicklung:

Radius des vegetativen Schwarmes (die Schwärme sind fast immer kreisrund) 10 Tage nach der Impfung, Angabe von Mittelwert und Amplitude. Die Größen der Schwärme in Parallelkulturen schwankten zum Teil stark, der angegebene Mittelwert dient nur zur besseren Übersicht; Genaueres ist aus der Amplitude zu ersehen.

Die Differenz der mittleren Schwarmgröße nach 5 Tagen (r_1) und nach 10 Tagen (r_2) kann als ungefähres Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit in diesem Zeitabschnitt gelten. Wo nur eine Messung gemacht wurde, geschah dies nach 10 Tagen.

Die Stärke der Schleimbildung, das Aussehen und die Färbung des Schwarmes ergaben in den Versuchen keine starken Abweichungen; sie werden daher nur in Ausnahmefällen im Text erwähnt.

Fruchtifikation:

Fruchtkörperentwicklung: Anl. 1 = erste Fruchtkörperanlagen: Beginn von Sporenbildung und Schleimansammlung. Anl. 2 = fortgeschrittene Fruchtkörperanlagen: große Sporenanhäufungen und Schleimmassen ohne endgültige Formung. fert. = fertige, vollkommen entwickelte Fruchtkörper.

Stärke der Fruchtkörperbildung: Wertungsstufen entsprechend der Anzahl der — geschätzten bzw. gezählten — Fruchtkörper: Stufe 0 = keine, Stufe 1 = 1 bis 10, Stufe 2 = 10—30, Stufe 3 = 30—100, Stufe 4 = über 100 je veget. Schwarm.

Wenn in Parallelkulturen mehrere Stufen auftraten, sind alle angegeben.

Bei *Podangium erectum* wird an Stelle der Zahl der Fruchtkörper die der Sori angegeben, dazu deren mittlerer Durchmesser.

Durchschnittliche Größe der Fruchtkörper: Es wurden die am häufigsten in Stichproben-Messungen vorgefundenen Größen gewählt (bei runden Fruchtkörpern Angabe des Durchmessers, sonst Länge und Breite; bei Ausbildung von Stielen deren Höhe und der Durchmesser des Köpfchens).

Angaben über die Stärke der Fruchtkörperbildung und über die Größe der Fruchtkörper sind nur dann in die Tabellen eingetragen, wenn fertig entwickelte Fruchtkörper vorhanden waren¹.

Form und Farbe der Fruchtkörper zeigten nur in wenigen Versuchen starke Abweichungen von der Norm; sie werden deshalb nur in solchen Fällen kurz im Text erwähnt.

5. Systematische Einordnung und Beschreibung der Versuchsorganismen.

Die morphologischen Gesichtspunkte der JAHNSchen Systematik sollten nach den Forderungen aller neueren Autoren (SINGH 1947, KÜHLWEIN 1950, 1952, FINCK 1951) dringend durch die Angabe der physiologischen Fähigkeiten unterstützt werden, da die Veränderlichkeit der morphologischen Eigenschaften der Myxobakterien sehr groß ist. Deshalb kann die folgende Gleichsetzung der für die vorliegende Untersuchung rein kultivierten Arten mit den JAHNSchen nicht völlig sicher sein, ohne daß es zweckmäßig gewesen wäre, auf Grund geringer morphologischer Abweichungen neue Arten oder Varietäten aufzustellen. Von den morphologischen Merkmalen werden nur die Variationsbreiten angegeben werden.

Zu dem von JAHN angegebenen Unterschied zwischen *Polyangiaceen* und *Myxococcaceen* in der Form der Sporen (*Myxococcaceen*: zu kugeligen Gebilden verkürzte Stäbchen; *Polyangiaceen*: nicht abgerundete, verkürzte Stäbchen) kommt

¹ Die Größenangaben der Fruchtkörper bzw. Sori beziehen sich immer auf den Befund nach 10 Tagen.

nach den Beobachtungen in der vorliegenden Untersuchung, die sich allerdings nur auf die *Polyangiaceen* *Podangium erectum* und *Polyangium fuscum* und auf die *Myxococcaceen* *Myxococcus fulvus*, *M. virescens*, *M. stipitatus* und *Chondrococcus coralloides* erstrecken, noch ein neues morphologisches Merkmal der Familien hinzu: der Bau des vegetativen Schwarmes in Agarkulturen.

Bei den *Polyangiaceen* hat der Schwarm eine glänzende Oberfläche, liegt dem Agar als kräftige Haut mit dicken Schleimadern auf, die sich ganz vom Agar abrollen läßt (Abb. 1). Der Schleim ist von sehr zäher Konsistenz. Mikroskopisch sieht man die Stäbchen auf Bahnen verschiedener Stärke angeordnet, die radial, aber auch konzentrisch verlaufen können und am Rande arabeskenartig erscheinen.

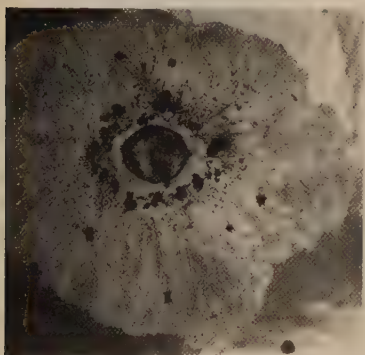


Abb. 1. *Podangium erectum*. Fütterungsversuch mit *Staphylococcus aureus* auf Kartoffeldekot-Agar. Der normalerweise nicht deutlich erkennbare Schwarm ist durch besondere Stellung der Lichtquelle gut sichtbar gemacht. In der Mitte runder Futterausstrich noch deutlich zu sehen (dunkle Fläche), Fruchtkörper-Sori zum größten Teil um den Ausstrich herum angeordnet. Die Oberfläche des Schwarmes erscheint geändert, die Adern selbst glänzen. Alter der Kultur 14 Tage. 1,6×

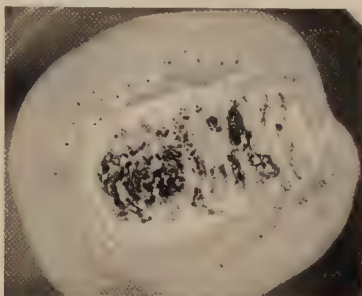


Abb. 2. *Myxococcus fulvus*. Fütterungsversuch mit *Bacterium ferrugineum* auf reinem Agar. Beleuchtung wie bei Abb. 1. Die Futterbakterien sind völlig gelöst, Fruchtkörper zum größten Teil im Bereich des ehemaligen rechteckigen Futterausstriches. Die Oberfläche des Schwarmes erscheint gleichmäßig und matt. Alter der Kultur 14 Tage. Natürl. Größe.

Bei den *Myxococcaceen* (Abb. 2) tritt der Schwarm in zwei Erscheinungsformen auf, die sich in den vorliegenden Versuchen als nicht völlig substratgebunden zeigten, da sie unter gleichen Bedingungen auf demselben Nährboden auftraten. Vielleicht hängen sie mit physikalischen Verhältnissen zusammen, die durch verschiedene Anbringung des Impfmateri als geschaffen werden (Verletzung des Agars, Einbohrung des Impfmateri als in den Agar). Die häufigere Form des Schwarmes hat eine matte Oberfläche und liegt dem Agar gleichmäßig dünn auf, der Schwarm läßt sich mit der Impfnadel völlig abkratzen, der Schleim ist wenig zäh. Mikroskopisch sieht man im Schwarmgebiet unregelmäßig gelagerte Stäbchen, in den Randzonen ist die Anordnung etwas mehr netzartig, der Rand ist durch vorspringende Schleimzungen mit Stäbchen leicht gezackt. Die zweite Form des Schwarmes hat eine glänzende

Oberfläche, ist leicht in den Agar eingesenkt und ist nicht ohne Verletzung des Agars abzunehmen; mikroskopisch sieht man die Stäbchen in die Agaroberfläche eingebohrt, Schleim ist kaum festzustellen.

Bei den drei untersuchten *Myxococcus*-Arten traten gleiche Fruchtkörpertypen auf: ungestielte kugelige (Abb. 3a) oder keulige Fruchtkörper (Abb. 5), die nach unten eingeschnürt sind, und gestielte kugelige Fruchtkörper (Abb. 4). Durch Fusion mehrerer Fruchtkörper entstanden

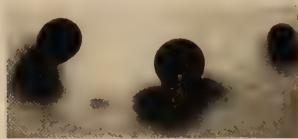


Abb. 3a.



Abb. 3b.



Abb. 3c.

Abb. 3. Fruchtkörpertypen bei *Myxococcus fulvus*, a rund, b wulstig, c langgestreckt. 60×.

häufig wulstige (Abb. 3b) bis langgestreckte wurstähnliche Gebilde (Abb. 3c), eine Erscheinung, die STANIER (1942) in Zusammenhang mit bestimmten Spannungsrichtungen im Agar bringt, denen die Bewegung

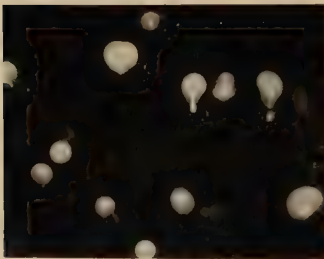


Abb. 4.



Abb. 5.



Abb. 6.

Abb. 4. *Myxococcus fulvus*, Rohkultur auf Mist. 25×.Abb. 5. *Myxococcus fulvus*, Rohkultur auf Mist. 40×.Abb. 6. Fruchtkörper-Sori von *Podangium erectum*. 48×.

der Myxobakterien folgt (Elasticotaxis). Bei *Podangium* war vor allem die Ausbildung der Stiele verschieden deutlich, sie konnten auch fehlen. Fertige Fruchtkörper, wegen der festen Wandung bei *Podangium* als Cysten bezeichnet, traten nie als wulstige oder langgestreckte Gebilde auf. Bei allen untersuchten Myxobakterien erschienen aber unter bestimmten Bedingungen Fruchtkörper, die man wohl als stehengebliebene Entwicklungsstufen bezeichnen darf, da sie auch bei der Ausbildung vollkommener Fruchtkörper als Zwischenstadien auftreten. Solche

unvollkommenen Fruchtkörper können sich bei Übertragung in geeignete Bedingungen (z. B. ein neues Nährsubstrat in den untersuchten Fällen) noch zu vollkommenen entwickeln.

Zur besseren Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Arten sind ihre Merkmale in Tab. 2 zusammengestellt¹.

II. Hauptversuche.

1. Entwicklung auf Nährböden chemisch definierter Zusammensetzung.

Die Verwertbarkeit einiger C- und N-Quellen wurde an *Myxococcus fulvus* und *M. virescens* geprüft, über deren Nährstoffbedürfnis bereits einige, aber nicht völlig übereinstimmende Angaben vorliegen.

Während nach OXFORD u. SINGH (1946) nur ein totales Säurehydrolysat des Caseins den Myxokokken vollkommene Entwicklung gestattet und nach SINGH (1947) auf Asparagin-Agar nur vegetatives Wachstum eintritt, ergab bei FINCK (1951) schon Mischung weniger Aminosäuren und bei KÜHLWEIN (1950) und FINCK (1951) schon Asparagin-Agar + C-Quellen gutes vegetatives Wachstum mit Fruktifikation. Nach QUEHL (1906), JAHN (1936) und BEEBE (1943) ist anorganischer Stickstoff für die Myxobakterien nicht brauchbar, nach KÜHLWEIN (1950) führt er dagegen bei *Myxococcus fulvus* zu sehr gutem Wachstum und reichlicher Fruktifikation. Harnstoff hat nach KÜHLWEIN eine ähnlich gute Wirkung. Pepton wird übereinstimmend bei QUEHL (1906), VAHLE (1909), SOLNTZEWA (1941), IMSENECKI (1946) und FINCK (1951) als brauchbar angegeben, wobei die Fruktifikation allerdings nur bei sehr niedrigen Gaben gefördert wird und nach FINCK eine typische kompakte Wuchsform des Schwarmes auftritt. Während nach BEEBE (1943) Monosaccharide das Wachstum der Myxokokken hemmen sollen, sind sie nach JAHN (1936), KÜHLWEIN (1950) und FINCK (1951) brauchbar. Stärke ist übereinstimmend nach JAHN (1936), SOLNTZEWA (1941), BEEBE (1943) und KÜHLWEIN (1951) gut verwertbar.

Die Nährböden enthielten außer C- und N-Quellen (s. Tab. 3) eine Mineralsalzlösung nach A. MEYER². Die Glucose wurde als steriles Filtrat zugesetzt (Vermeidung eventuell toxischer Produkte durch Hitzesterilisation). Es wurden Pepton „Witte“ und lösliche Stärke verwendet. Als Vergleichskulturen zu den eigentlichen Versuchen mit kombinierten C- und N-Quellen wurden N-freie Kulturen (C-Quelle + Mineralsalzlösung) angelegt.

Der Versuch (Tab. 3) ergab folgendes: Der Vergleich der N-freien Kulturen mit der Kontrolle (auf reinem Agar) zeigte, daß bei *Myxococcus virescens* das vegetative Wachstum durch Glucose schwach, durch Stärke etwas mehr gefördert wird. Von den Stickstoffverbindungen beeinflussten nur Asparaginsäure und Pepton die vegetative Entwicklung positiv, während Harnstoff in Verbindung mit Glucose, ferner $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ keine Wirkung gegenüber den N-freien Vergleichskulturen hatten. Harnstoff mit Stärke, ferner Ammoniumtartrat hemmten dagegen. Auf die Fruktifikation hatte keiner der Zusätze fördernde Wirkung; es trat

¹ Die Messungen der Stäbchen- und Sporengrößen stammen von Reinkulturen auf verschiedenen Nährböden, die Angaben über Farb- und Größenvariation der Fruchtkörper und über die Färbung der vegetativen Schwärme aus verschiedenen physiologischen Versuchen.

² 1 g KH_2PO_4 + 0,1 g CaCl_2 + 0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ + 0,1 g NaCl + 0,01 g FeCl_3 + 1000 cm³ Wasser.

Tabelle 2. Die Merkmale der in de

Art	Färbung des vegetat. Schwarms	Stäbchen			Größe			Form
		Länge	Breite	Form	Frucht- körper oder Cysten- durch- messer	Stiel- höhe	Stiel- durch- messer	
<i>Myxo- coccus fulvus</i> (Abb. 2 bis 5)	Farblos, weiß, rosa (Anfärb. d. Agars im Schwarm- bereich)	4 bis 10 μ	0,5 bis 0,7 μ	Schlank, Enden spitz	50 bis 500 μ (aus- nahms- weise bis 1000 μ)	—	—	Kugelig, keulig, manchmal wul- stig, oft lang- gestreckt, selten gestielt
<i>Myxo- coccus virescens</i>	Farblos, blaßgelb, leucht. citronen- gelb (An- färbung d. Agars im Schwarm- bereich)	2 bis 7 μ	0,5 bis 0,7 μ	Schlank, Enden spitz	50 bis 300 μ	—	—	Häufig wulstig od. langgestr., selten rund, nicht gestielt
<i>Myxo- coccus stipita- tus</i>	Farblos	3 bis 8 μ	0,5 bis 0,7 μ	Schlank, Enden spitz	50 bis 500 μ	100 bis 200 μ	50 μ	Meistens deutl. gestielt, kugelig, selten wulstig
<i>Podangi- um erec- tum</i> (Abb. 6)	Farblos gelb, rot- braun. (keine An- färbg. d. Agars)	4 bis 8 μ	Ende: 0,5 μ Mitte: 0,8 μ	Spindel- förmig, Enden spitz	30 bis 80 μ	50 bis 100 μ	20 bis 30 μ	Meist gestielt m. runden Cysten, auch keulig, zylindrisch ohne deutl. Stiel, selten Stiele ohne Cysten, Cystenwand innen leicht gerieft

sogar eine Unterdrückung der Fruktifikation durch Ammoniumtartrat und Pepton, durch Harnstoff in Verbindung mit Stärke, ferner durch $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ in Verbindung mit Glucose ein. Die runde bis wulstige Form und die gelbgrüne Farbe der Fruchtkörper blieben in allen Versuchen ungefähr gleich, die Schleimaufgabe des Schwarms war bei Pepton besonders kräftig.

Versuchen verwendeten Arten.

Körper			Sporen		Herkunft
Farbe	Konsistenz	Anordnung	Form	Größe	
Rosa, ziegelrot, braunrot	Oberfl. glasig-blank. Keine feste Membran, zerfließlich	Einzel	Rund	Durchmesser: 1—1,2 μ	Hasenmist, Göttinger Wald
Blaßgelb, leuchtend citronengelb	Oberfl. glasig-blank. Keine feste Membran, zerfließlich	Einzel	Rund	Durchmesser: 2—2,3 μ	Bodenprobe aus Botan. Garten Göttingen
Rosa, violett, Stiele gelbbraun	Oberfl. glasig-blank. Keine feste Membr., zerfließlich, Stiele nicht zerfließlich	Entwicklung zu mehr. aus einer Schleimmasse, häufig bleibt ein gemeins. basaler Schleimklump. erhalten	Rund-ellipsoid	Durchmesser: 0,8—1,0 1,0—1,2 μ	Bodenprobe aus Bergbauschutthalen Langelsheim, Harz
Gelbweiß, gelbbraun, rot, rotbr., braun, Stiele grauweiß	Cysten u. Stiele nicht zerfließlich, m. fester Membran, jedoch zerquetschbar	Entw. zu vielen aus Schleimmasse, bis zu m. 100 i. Gruppen (Sori) vereinigt. Sorusdurchm. 200—1000 μ . Cyst. häufig Rest eines gemeins. Schleimklump. aufsitzend	Verkürzt. Stäbchen	Länge: 3—4 μ Breite: 0,8 μ	Kaninchenmist, Badberg, Kaiserstuhl

Hemmung der Entwicklung durch Glucose, wie sie BEEBE (1943) allgemein für Monosaccharide annimmt, ließ sich nicht bestätigen. Die Wirkung der Stärke entsprach den Literaturangaben; ebenso die des Peptons (kompakte Wuchsform!). Die Förderung des vegetativen Wachstums durch Asparaginsäure stimmte mit SINGH (1947) überein, dagegen ließ sich gute Fruktifikation, wie sie KÜHLWEIN

(1950) und FINCK (1951) für Asparagin bzw. Asparaginsäure + Glucose angeben, nicht feststellen. Daß *Myxococcus virescens* anorganischen Stickstoff nicht verwerten konnte, deckt sich mit KÜHLWEINS Ergebnissen.

Bei *Myxococcus fulvus*¹ wirkte Glucose ebenfalls schwach, Stärke etwas mehr fördernd auf die vegetative Entwicklung. Stärkeres vegetatives Wachstum wurde durch Asparaginsäure und Pepton hervorgerufen, eine schwache Förderung ergab auch Harnstoff in Verbindung mit Glucose. Harnstoff mit Stärke, ferner Ammoniumtartrat und ebenso $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ wirkten hingegen hemmend, und zwar verschieden stark. Stärke förderte die Fruktifikation geringfügig, ebenso Harnstoff (nur in Verbindung mit Glucose) und Asparaginsäure.

Tabelle 3. *Myxococcus virescens*. Entwicklung auf Nährböden von chemisch definierter Zusammensetzung. Mittelwerte aus 5 Parallelkulturen¹.

C- und N-Quellen ²	Vegetative Entwicklung		Fruktifikation		
	Radius des Schwarmes (mm)		Fruchtkörperentwicklung	Stärke der Fruchtkörperbildung	Größe ³ der Fruchtkörper (μ)
	Mittel	Amplitude			
Versuch					
Stärke + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	9	6—11	fert.	1	100
Stärke + NH_4 -tartrat . . .	1	1	keine		
Stärke + Harnstoff	2	1—4	keine		
Stärke + Asparaginsäure . .	13	9—14	fert.	1	100
Stärke + Pepton	12	10—13	keine		
Glucose + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	5	5	keine		
Glucose + NH_4 -tartrat . . .	1	1	keine		
Glucose + Harnstoff	7	2—12	fert.	1	100
Glucose + Asparaginsäure . .	10	8—12	fert.	1	100
Glucose + Pepton	10	8—13	keine		
N-freie Vergleichungskultur.					
Stärke	9	6—12	fert.	1	100
Glucose	6	5—9	fert.	1	100
Kontrollen (reiner Agar)	4	2—6	fert.	1	100

¹ Bedeutung der Tabellenspalten siehe im methodischen Teil.

² Konzentration der C-Quellen immer 0,5%, der N-Quellen immer 0,1%.

³ Die Fruchtkörpergröße wird in allen Tabellen auf volle 50 μ abgerundet angegeben.

Auch hier entsprach die Wirkung der Glucose nicht den BEEBESchen Angaben (1943), die Ergebnisse für Stärke und Pepton stimmten mit der Literatur überein. Die Resultate bei $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, Harnstoff, Asparaginsäure in Verbindung mit den C-Quellen (Glucose und Stärke) und für beide C-Quellen allein weichen aber von KÜHLWEINS Beobachtungen ab, der auf allen diesen Substraten — aber auch schon auf den C-Quellen allein — sehr gute vegetative und fruktifikative Entwicklung angibt (wobei allerdings die Entwicklungsstärke nicht quantitativ belegt ist). Die Nichtverwertung von anorganischem Stickstoff deckt sich aber mit älteren Angaben, die fördernde Wirkung der Asparaginsäure auf die vegetative Phase allein mit denen SINGHS.

¹ Auf die Wiedergabe der Tabelle für *M. fulvus* wird hier zur Platzersparnis verzichtet.

Aus dem Versuch ergibt sich also: In den geprüften Konzentrationen und Kombinationen hatte Glucose geringe fördernde, Stärke gute fördernde Wirkung auf die vegetative Phase der beiden *Myxococcus*-Arten. Anorganischer Stickstoff wurde nicht verwertet, Harnstoff zeigte keinen deutlichen Einfluß, Asparaginsäure und Pepton hatten positive Wirkung auf das vegetative Wachstum. Wie sich aus späteren Versuchen zeigen wird, war jedoch die vegetative Entwicklung wie die Fruktifikation in keinem Fall so gut wie bei einem günstigen lebenden Bakterienfutter.

Bei *Podangium erectum*, mit dem nur wenige Versuche gemacht wurden, beeinflusste anorganischer Stickstoff weder in Verbindung mit Stärke noch Glucose das Wachstum, während Asparaginsäure mit Stärke wie bei den *Myxococcus*-Arten eine Förderung der vegetativen Phase bewirkte.

Angesichts der Widersprüche zu einigen der Literaturangaben wäre die Möglichkeit in Erwägung zu ziehen, ob bei den Myxobakterien die Arten in Stämme mit sehr verschiedenen physiologischen Fähigkeiten zerfallen, wodurch die unterschiedlichen Beobachtungen eine ganz andere Bedeutung bekämen. Andererseits zeigen die Werte in Tab. 3, wie wichtig für die Beurteilung der Versuchsergebnisse der Vergleich mit Kontrollkulturen ist, was manche Autoren wohl nicht genügend berücksichtigt haben.

2. Entwicklung auf Böden mit toten Bakterien als Futter und verschiedenen Zusätzen (C- und N-Quellen, Wirkstoffe).

Da die Entwicklung der Myxobakterien auf Bakterienfutter-Böden nicht so kräftig wie mit dem gleichen lebenden Futter ist, wurden einige C- und N-Quellen, vor allem aber Wirkstoffe zugesetzt, um diese Futterböden möglichst noch zu verbessern. Andererseits sollte so die Wirkung der zugesetzten Stoffe unter Bedingungen geprüft werden, wie sie bisher noch nicht näher durchgeführt worden sind (lediglich BEEBE hat schon einige C-Quellen zu *Coli*-Agar zugesetzt). Als Versuchsobjekte dienten *Myxococcus virescens* und *fulvus*.

Herstellung der Bakterienfutter-Böden mit *Escherichia coli* in der üblichen Weise; Zugabe der Zusätze (s. Tab. 4) vor dem Sterilisieren. Die verwendete Stärke war dieses Mal *Amylum marantae*, das Casein war vitaminfreies Casein Merck. Als Wirkstoffe wurden die zur Verfügung stehenden Vitamine der B-Gruppe, Paraaminbenzoesäure und Vitamin C (alle von Merck), als komplexe B-Gruppe wurden Aneurin, Lactoflavin, Nicotinsäureamid, pantothen-saures Calcium und Adermin zugesetzt (Konzentration jeder Komponente $1 \cdot 10^{-3}$ bzw. $1 \cdot 10^{-4} \%$). Alle Vitamine mit Ausnahme der hitzebeständigen (Adermin, Lactoflavin, Nicotinsäureamid) wurden mit Membranfiltern steril filtriert und dem abgekühlten Agar vor dem Gießen der Böden steril zugesetzt.

Schließlich wurde ein weiteres Futterbakterium (*Staphylococcus aureus*) als Zusatz benutzt (die Konzentration in Tab. 4 bezieht sich auf das Trockengewicht der zugesetzten Bakterienmasse). Als Kontrolle dienten dieses Mal Bakterienfutterböden ohne Zusätze.

Ergebnis mit *Myxococcus virescens* (Tab. 4):

Tabelle 4. *Myxococcus virescens*. Entwicklung auf Böden mit toten Bakterien als Futter und verschiedenen Zusätzen (C- und N-Quellen, Wirkstoffe). Mittelwerte aus 5 Parallelkulturen.

Zugesetzte Substanzen		Versuch						Kontrolle			
		Vegetative Entwicklung		Fruktifikation			Vegetative Entwicklung		Fruktifikation		
Radius des Schwarmes (mm)		Fruchtkörper-entwicklung	Stärke der Fruchtkörper-bildung	Größe der Fruchtkörper (μ)	Radius des Schwarmes (mm)		Fruchtkörper-entwicklung	Stärke der Fruchtkörper-bildung	Größe der Fruchtkörper (μ)		
Mittel	Amplitude				Mittel	Amplitude					
Glucose	0,5 %	6	4—9	fert.	3	100	11	10—12	fert.	3	100
"	0,05%	12	7—15	fert.	4	100					
Saccharose	0,5 %	12	11—15	fert.	1	100	14	13—15	fert.	1—2	100
"	0,05%	14	11—15	fert.	1—2	100					
Stärke	0,5 %	18	17—20	fert.	1—2	100	14	13—15	fert.	1—2	100
"	0,05%	16	12—21	fert.	1—2	100					
Pepton	0,5 %	19	15—20	keine			11	10—12	fert.	3	100
"	0,05%	17	14—20	fert.	3—4	100 × 500					
Probacit	0,5 %						18	16—21	fert.	1—2	100
"	0,05%	15	12—20	fert.	1	50					
Casein	0,5 %	12	10—15	Anl. 2			18	16—20	fert.	2	100
"	0,05%	18	15—19	fert.	2	100					
Aneurin	5 × 10 ⁻³ %	10	9—13	keine			16	14—18	fert.	2	100
"	5 × 10 ⁻⁴ %	11	9—13	fert.	1	100					
Lactoflavin	5 × 10 ⁻³ %	8	7—9	keine			14	11—15	fert.	2	150
"	5 × 10 ⁻⁴ %	11	10—13	Anl. 2							
Nicotins.-amid											
"	5 × 10 ⁻³ %	15	9—20	fert.	2	200	13	11—15	fert.	2—3	150
"	5 × 10 ⁻⁴ %	16	14—17	fert.	2—3	150					
pantothers. Ca	5 × 10 ⁻³ %	11	9—12	fert.	1	150	13	11—15	fert.	2—3	150
"	5 × 10 ⁻⁴ %	14	11—15	fert.	2	150					
Adermin	5 × 10 ⁻³ %	9	8—11	keine			16	14—18	fert.	2	100
"	5 × 10 ⁻⁴ %	15	12—19	fert.	1	100					
B ₁₂	5 × 10 ⁻⁶ %	17	15—18	fert.	2—3	100	18	16—21	fert.	2	100
"	5 × 10 ⁻⁷ %	16	15—18	fert.	2	100					
B-Gruppe	1 × 10 ⁻³ %	9	5—10	Anl. 1			16	14—18	fert.	2	100
"	1 × 10 ⁻⁴ %	14	10—17	fert.	1	100					
p-Aminobenzoës.											
"	5 × 10 ⁻³ %	14	13—16	fert.	1—2	100	18	16—21	fert.	2	100
"	5 × 10 ⁻⁴ %	16	11—20	fert.	1—2	150					
Ascorbinsäure	5 × 10 ⁻³ %	14	12—15	fert.	2	100	18	16—21	fert.	2	100
"	5 × 10 ⁻⁴ %	16	14—18	fert.	2	100					
Staph. aureus	0,15 %	20	18—21	fert.	3	100	18	16—20	fert.	2	100

Die Kontrollkulturen waren nicht ganz gleichartig entwickelt, obwohl sie sich alle auf *Coli*-Futter-Böden befanden. Das hängt wohl damit zusammen, daß sich der ganze Versuch aus mehreren Impfserien mit jeweils neu hergestellten Futterböden und neuem Impfmateriel zusammensetzte. Für die Beurteilung des Versuchs spielt der verschiedene Ausfall der Kontrollen aber keine Rolle, da ja nur relativ gewertet wurde.

C- Quellen: Während Glucose in der höheren Konzentration die vegetative Phase stärker, Saccharose sie schwächer hemmte und beide in der geringeren Konzentration ohne Wirkung waren, förderte Stärke das vegetative Wachstum immer, und zwar zunehmend mit steigender Konzentration. Auf die Fruktifikation wirkte nur die geringere Glucosekonzentration fördernd ein.

Die Wirkung von Mono-, Di- und Polysaccharid entspricht BEEBES (1943) Angaben, nämlich abnehmende Hemmung und zunehmende Förderung in der Richtung vom Mono- zum Polysaccharid. Sie wurde von ihm auch ohne Bakterienfutter bemerkt, was bei dem vorhergehenden Versuch mit definierten Nährböden (s. Tab. 3) bezüglich der Stärke und Glucose aber nicht zum Ausdruck kam.

N- Quellen: Probacit wirkte in der höheren Konzentration völlig, in der geringeren Konzentration schwächer hemmend auf beide Entwicklungsphasen; Casein beeinträchtigte in der höheren Konzentration zwar die fruktifikative Phase und die Ausdehnung des Schwarmes, führte aber zu sehr kräftiger Schleimbildung. Die geringere Konzentration des Caseins hatte keinen deutlichen Effekt. Pepton förderte das vegetative Wachstum stark, wobei neben großer Ausdehnung die für Pepton typische kompakte Wuchsform des Schwarmes mit starker Schleimbildung zu beobachten war. In der höheren Konzentration unterdrückte das Pepton die Fruktifikation völlig, in der geringeren Konzentration wirkte es sogar fördernd.

Wirkstoffe:

Über das Wuchsstoffbedürfnis der *Myxococcaceen* liegt erst eine Untersuchung vor (FINCK 1951). Die dabei herrschenden Bedingungen waren aber andere als bei den vorliegenden Versuchen und vor allem gestatteten die Ergebnisse noch keinen Überblick; sie lassen sich daher kaum in Beziehung zu den vorliegenden Resultaten setzen.

Aneurin, Lactoflavin und die B-Gruppe hemmten in beiden Konzentrationen sowohl die vegetative Entwicklung wie die Fruchtkörperbildung, pantothen-saures Calcium und Adermin nur in der höheren Konzentration. Eine leichte Bremsung der vegetativen Phase allein bewirkten Paraaminobenzoesäure und Ascorbinsäure in beiden Konzentrationen; keinen deutlichen Einfluß auf die vegetative Entwicklung zeigten pantothen-saures Calcium und Adermin in der geringen Konzentration, B₁₂ in beiden Konzentrationen. Eine Hemmung der Fruktifikation trat bei Adermin in der geringen Konzentration ein. Keine Beeinflussung der Fruktifikation ergab sich bei Nicotinsäureamid, Paraamino-

benzoesäure und Ascorbinsäure in beiden Konzentrationen, bei Calcium-pantothenat und B₁₂ in der geringeren Konzentration. Förderung des vegetativen Wachstums erfolgte nur durch Nicotinsäureamid in beiden Konzentrationen, etwas erhöhte Fruktifikation durch B₁₂ in der höheren Konzentration.

Der Zusatz von *Staphylococcus aureus* (als zweites Futterbakterium) förderte die vegetative und die fruktifikative Phase.

Ergebnis mit *Myxococcus fulvus*:

C-Quellen: Die hemmende Wirkung der Kohlenhydrate war viel schwächer als bei *Myxococcus virescens*, sie beschränkte sich auf die höhere Glucosekonzentration; alle anderen Zusätze förderten Wachstum und Fruktifikation.

N-Quellen: Die Wirkungen von Probacit, Pepton und Casein in der niedrigeren Gabe entsprachen ungefähr den bei *Myxococcus virescens* geschilderten. Dagegen förderte das Casein in der höheren Konzentration die Fruktifikation bei etwas gehemmter Schwarmausdehnung und führte zu starker Schleimbildung.

Wirkstoffe: Hier ergabensich andere, aber nicht stärkere Effekte als bei *Myxococcus virescens*. Eine positive Beeinflussung der Fruktifikation zeigten Nicotinsäureamid und Lactoflavin in der geringeren Konzentration; das vegetative Wachstum wurde nur durch Lactoflavin in der niederen Gabe gefördert. Die jeweils andere Konzentration der genannten Zusätze sowie alle übrigen Wirkstoffe hatten keine oder eine hemmende Wirkung.

Der Zusatz von *Staphylococcus aureus* (als zweites Futterbakterium) förderte die Fruktifikation stark.

Hinsichtlich der Farbe traten bei beiden Arten keine starken Unterschiede zwischen Kontrollen und Zusatzversuchen auf, die Fruchtkörper von *Myxococcus virescens* waren gelbgrün, die von *Myxococcus fulvus* ziegelrot gefärbt; bei den letzteren führte jedoch der B₁₂-Zusatz zu einem deutlich gelbroten Farbton. Die Ausbildung der Form zeigte leichte Schwankungen zwischen rund und wulstig, ohne daß man daran deutlich eine Substratwirkung erkennen konnte. Die gelegentlich auftretenden langgestreckten Fruchtkörper, die meistens mit stark konzentrischer Anordnung verbunden waren, hängen wahrscheinlich nach STANIER (1942) mit physikalischen Verhältnissen zusammen.

Nur bei wenigen der zugesetzten Substanzen ergab sich also eine Förderung; über die Natur von in den Bakterienfutter-Böden nicht optimal vorhandenen Faktoren sagen die Versuche daher nichts Umfassendes aus. Die angewendeten Wirkstoffe scheinen in den Bakterienfutter-Böden in genügender Menge vorhanden zu sein, da ein weiterer Zusatz keine starken Effekte ergab. Dagegen förderten von den Nährstoffen die höhermolekularen z. T. gut; dem entspricht auch die starke positive Wirkung des zugesetzten zweiten Futterbakteriums.

3. Versuche mit lebenden Futterorganismen.

a) Einzelne Futterorganismen auf reinem Agar.

Die charakteristische Fähigkeit der Myxobakterien, sich allein von anderen lebenden Bakterien zu ernähren, ist von SINGH (1947) für einige *Myxococcaceen* sehr gründlich nachgewiesen worden. Es war nun eine lohnende Aufgabe, mit der SINGHschen Methode die Rolle des Bakterienfutters für einen Vertreter der *Polyangiaceen*, nämlich *Podangium erectum*, zu untersuchen, wobei zum Vergleich das Verhalten von *Myxococcus virescens* studiert wurde.

Um das Verhalten der ganzen Familien zu beurteilen, sind natürlich Versuche mit zahlreichen Arten nötig; hier sollte nur festgestellt werden, ob bei *Podangium erectum* grundsätzlich die gleichen bakteriolytischen Fähigkeiten vorliegen wie bei *Myxococcus virescens*, weil es darüber nur von BEEBE (1941) einige Beobachtungen gibt und für die hochorganisierten *Chondromyces*-Arten von KÜHLWEIN (1950, 1952) eine symbiontische Beziehung (ohne Lysis also) angenommen wird.

Das Verhalten der Myxobakterien gegenüber anderen Bakterien ist von SINGH (1947) als bakteriolytisch und an anderer Stelle (ANSCOMBE u. SINGH 1948) noch anschaulicher durch die Bezeichnung der Myxobakterien als „Mikroräuber“ (micropredators) charakterisiert worden.

Über die Beziehungen der Myxobakterien zu anderen Organismengruppen außer Bakterien ist noch nicht viel bekannt.

So hat SINGH (1947) beobachtet, daß Amöben durch Anwesenheit von Myxobakterien nicht geschädigt wurden, und bei JAHN (1915) und FINCK (1951) findet sich ein Hinweis auf Förderung durch Hefen; FINCK hat auch die Hemmung des Wachstums von Schimmelpilzen durch Myxobakterien untersucht.

In den nachstehenden Versuchen wurden die Beziehungen der Myxobakterien zu zwei Organismengruppen geprüft, die z. T. an deren natürlichem Standort, dem Erdboden, vorkommen und mit der SINGHschen Methode erfaßt werden können, nämlich zu Pilzen und Grünalgen.

Als Futterbakterien wurden 27 Stämme benutzt (s. Tab. 5), die als Reinkulturen von verschiedenen Instituten bezogen wurden. Von ihnen sind die Nr. 1 bis 10 gramnegativ, Nr. 11 ist variabel, der Rest grampositiv. Da möglich ist, daß sich in Rohkulturen von Myxobakterien vielleicht besonders wirksame Futterbakterien als Begleitorganismen befinden, wurden auch noch Isolierungen aus Rohkulturen von *Podangium erectum* (s. Tab. 5, Stämme A—E) und von *Myxococcus fulvus* (Stämme F—H) mit dem KOCHschen Plattenverfahren vorgenommen. Sie waren alle gramnegativ, außer F (grampositiv), bildeten keine Sporen und waren aerob.

Die verfütterten 10 Hefen (s. Tab. 8) stammten aus dem Institut für Mikrobiologie in Göttingen, und von den 8 Futteralgen (s. Tab. 11) war der *Chlamydomonas*-Stamm eine Abimpfung von MOEWUS-Heidelberg, die übrigen kamen aus der Sammlung von E. G. PRINGSHEIM-Cambridge.

α) Bakterien als Futterorganismen.

Kultursubstrat: Gewässerter 2% iger Agar + 0,5% NaCl¹, in PETRI-Schalen in ungefähr 5 mm dicker Schicht. In jeder Schale wurden von einem Futterbakterium zwei Ausstriche in Form zweier Rechtecke gemacht (jeweils 6 Ösen.

¹ Wegen der osmotischen Verhältnisse. Zugabe einer Mineralsalzlösung ist bei den Fütterungsversuchen nicht nötig.

Tabelle 5. Fütterung von *Myxococcus virescens* mit Bakterien auf reinem Agar ohne Nährstoffzusatz. Mittelwerte aus 8 Parallelkulturen.

Nr.	Futterbakterien ¹	Versuch										Kontrolle	
		Vegetative Entwicklung			Lysestärke	Fruchtifikation							
		Radius r_2 des Schwarmes nach 10 Tagen (mm)		$r_3 - r_1$		Fruchtkörperentwicklung		Stärke der Fruchtkörperbildung		Größe der Fruchtkörper (μ)			
		Mittel	Amplitude			1. Revis.	2. Revis.	1. Revis.	2. Revis.				
1.	<i>Pseudom. pyocyanea</i> I ²											5	
2.	<i>Pseudom. pyocyanea</i> II											5	
3.	<i>Bacterium radicum</i>	4	3—7	4	0	keine	fert.	—	1	100		4	
4.	<i>Pseudom. tumefaciens</i>	7	3—10	7	0—1	keine	fert.	—	2	200		5	
5.	<i>Escherichia coli</i>	15	12—17	3	2	fert.	fert.	0—2	3	200		5	
6.	<i>Aerobacter aerogenes</i>	20	16—27	10	2	keine	fert.	—	2—3	200		5	
7.	<i>Bact. prodigiosum</i> I											5	
8.	<i>Bact. prodigiosum</i> II											5	
9.	<i>Proteus vulgaris</i>	13	10—18	4	2	fert.	fert.	1—4	2—4	250		5	
10.	<i>Bact. ferrugineum</i>	13	10—15	8	2	fert.	fert.	2—3	3—4	250		4	
11.	<i>Sarcina agilis</i>	12	4—20	7	2	fert.	fert.	1	2	500 × 100		5	
12.	<i>Staphyloc. albus</i>	11	4—16	4	1	fert.	fert.	1	2	150		5	
13.	<i>Staphyloc. aureus</i>	19	18—20	7	1	keine	fert.	—	1—2	100		5	
14.	Rote Luftkokken	12	5—20	7	1	fert.	fert.	1	2	150		5	
15.	<i>Sarcina lutea</i>	20	17—25	8	1	keine	Anl. I					4	
16.	Braune <i>Sarcina</i>	17	15—22	6	1	fert.	fert.	2	3	200		4	
17.	<i>Bacillus subtilis</i> I	17	15—18	10	0	keine	fert.	—	2	150 × 50		4	
18.	<i>Bacillus subtilis</i> II	15	10—20	5	1	keine	keine					5	
19.	<i>Bac. ellenbachensis</i>	10	3—15	9	0	keine	fert.	—	1	200 × 50		4	
20.	<i>Bacillus mycoides</i> I	10	8—12	2	0—1	fert.	fert.	1	1—2	200		5	
21.	<i>Bacillus mycoides</i> II	?	?	?	1	fert.	fert.	1	1	150		5	
22.	<i>Bac. mesentericus</i> I	16	12—20	4	0—1	fert.	fert.	1	2	150		4	
23.	<i>Bac. mesentericus</i> II	15	9—21	6	1	fert.	fert.	1	2	200		5	
24.	<i>Bacillus silvaticus</i>	9	3—11	2	1	fert.	fert.	1	1—2	150		4	
25.	<i>Bacillus luteus</i>											4	
26.	<i>Mycobacterium phlei</i>	4	3—5	4	0	keine	keine					4	
27.	<i>Proactinomyces citreus</i>											5	
28.	Stamm A	10	8—14	3	1	Anl. I	fert.	—	1—2	100		2	
29.	Stamm B	15	13—17	6	2	Anl. I	fert.	—	3—4	100		2	
30.	Stamm C	13	10—16	4	1	Anl. I	fert.	—	2—3	150		2	
31.	Stamm D	16	15—18	4	1	Anl. 2	fert.	—	3	150		2	
32.	Stamm E	15	9—18	5	2	Anl. 2	fert.	—	2—3	250 × 50		2	
33.	Stamm F											2	
34.	Stamm G											2	
35.	Stamm H	10	10	5	1	keine	keine					—	

¹ Gebräuchliche Artnamen. In BERGEYS Manual werden einige der Arten (sofern dort überhaupt aufgenommen) unter den folgenden abweichenden Namen geführt: 1., 2. *Pseudomonas aeruginosa*, 3. *Rhizobium leguminosarum*, 4. *Agrobacterium tumefaciens*, 7., 8. *Serratia marcescens*, 11. *Micrococcus pyogenes* var. *albus*, 12. *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, 19. *Bacillus cereus*, 20, 21. *Bacillus cereus* var. *mycoides*, 24. *Bacillus megatherium*, 27. *Nocardia citrea*.

² Die mit I und II bezeichneten Stämme sind verschiedener Herkunft.

Ösendurchmesser 2 mm); so konnten 8 Parallelversuche in vier PETRI-Schalen untergebracht werden (wozu in der vierten Schale noch ein dritter Futterausstrich kam, der nicht mit Myxobakterien beimpft wurde, um das Verhalten der Futterbakterien ohne Myxobakterien beurteilen zu können, Abb. 9). Die Futterausstriche wurden sofort zentral mit Myxobakterien beimpft (Abb. 7, 9). Kontrollkulturen auf reinem Agar ohne Futterausstrich.

Zur besseren Bewertung des Ergebnisses ist in Tab. 5 und 6 noch ein neuer Gesichtspunkt aufgenommen worden: die Lysisstärke. Geeignete Futterorganismen werden durch die Myxobakterien so stark aufgelöst, daß man ihr Verschwinden deutlich in dem vorher gleichmäßigen Ausstrich erkennt, meistens in Form eines Loches, das dann vom Myxobaktérienschwärm ausgefüllt ist (Abb. 7, 8). Es kann sogar zu einem restlosen Verschwinden kommen (Abb. 9), so daß Ausstriche aus der ehemaligen Futterbakterienzone auf Probacit-Agar kein Wachstum mehr ergeben. Die Lysisstärke wurde nur nach makroskopischer Beobachtung festgelegt: 0 = keine Lysis erkennbar, 1 = Futterbakterien im Schwarmbereich z. T. verschwunden, 2 = Futterbakterien im Schwarmbereich völlig verschwunden.



Abb. 7.

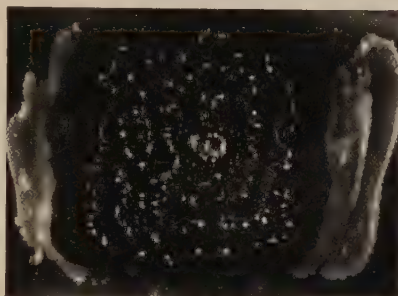


Abb. 8.

Abb. 7. *Myxococcus fulvus*, Fütterungsversuch mit Bakterien-Stamm C auf reinem Agar. Die beiden ursprünglich rechteckigen Futterausstriche sind durch Myxobakterien im Schwarmbereich (dunkel) völlig gelöst, nur ihre Ränder (hell) sind noch erhalten. $0,6 \times$.

Abb. 8. Rechter Ausstrich von Abb. 7 stärker vergrößert und um 90° gedreht; helle Punkte: Fruchtkörper; zwischen ihnen sehr feine ausgefallene Kristalle. $2 \times$.

In den Fällen, wo die Lysis makroskopisch nicht erkennbar war — wie bei den Sporenbildnern, wo nur die Stäbchen, nicht die Sporen gelöst werden und diese liegen bleiben — gibt die Stärke der Myxobakterienentwicklung Auskunft, ob die Futterorganismen verwertet wurden.

Das Aussehen solcher Kulturen mit lebendem Futter ist schon von SINGH (1947) beschrieben worden, deshalb sei hier nur gesagt: Die Myxobaktérienschwärme breiten sich im und über den Futterausstrich hinaus ziemlich kreisförmig aus, die Fruchtkörper werden aber meistens nur im Bereich des Futterausstriches gebildet (s. Abb. 2).

Bei der Beurteilung der Ergebnisse der jeweils acht Parallelversuche muß man bedenken: Während der positive Ausfall eines Fütterungsversuches ein klarer Beleg für die Verwertung des geprüften Futters ist, ist ein negativer noch kein Beweis dafür, daß sich die Myxobakterien mit diesem Futter überhaupt nicht entwickeln können. Es kommen nämlich auch Fälle vor, wo nur einige der Parallelkulturen positiv ausfielen. Diese sind dann meistens nicht sehr stark entwickelt; deshalb kann man wohl allgemein sagen, je weniger geeignet ein Futterbakterium ist, um so schwerer bzw. langsamer wächst das dazugeimpfte Myxobakterium überhaupt an. Einzelheiten über die Versuche sind in den Tab. 5 und 6 enthalten, hier sollen nur allgemeine Punkte angeführt werden.

Myxococcus virescens (Tab. 5, Abb. 9) entwickelte sich mit einer großen Zahl von Futterbakterien gut, wobei auch die Schleimbildung kräftig war. Die geeigneten Futterorganismen lassen sich nicht in einen bestimmten Zusammenhang miteinander bringen, sie gehören verschiedenen systematischen und physiologischen Gruppen an. An Hand der vegetativen Entwicklung, der Fruktifikation und der Lysisstärke läßt sich sagen: von den 17 gramnegativen Bakterien wurden 6 sehr gut, 6 mäßig bis gut und 5 nicht verwertet. Von 17 grampositiven waren 4 nicht, die übrigen mäßig bis gut brauchbar; dabei waren Kokken und Sarcinen günstiger als die Sporenbildner. Von den 9 nicht verwerteten Bakterien waren 7 stark pigmentiert, von den 24 verwerteten Bakterien nur 6. Das entspricht SINGHs Angaben (1947) für *Myxococcus virescens*.

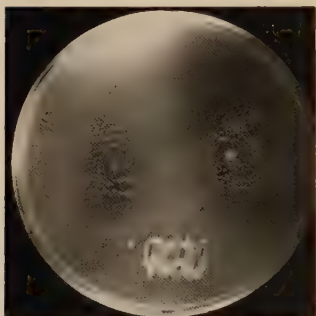


Abb. 9. *Myxococc. viresc.* Fütterungsversuch mit *Proteus vulg.* auf reinem Agar. Zwei ursprünglich rechteckige Futterausstriche durch die Myxobakt. völlig gelöst, Kontrollausstrich ohne Myxobakt. (unt.) nocherhalten, $0,4 \times$.

Auch *Podangium erectum* (Tab. 6) ist fähig, Futterbakterien zu lösen und sich mit ihnen zu entwickeln. Es verwertete jedoch eine geringere Zahl von Futterbakterien als *Myxococcus virescens* und bildete nur mit sehr wenigen normale und zahlreiche Fruchtkörper. Die Schleimbildung variierte von schwach bis kräftig. Auffällig ist auch, daß starke Lysis und gute Entwicklung nicht immer völlig parallel gingen. Von den 17 gramnegativen Bakterien wurden 7 nicht, 2 sehr gut (mit normaler Fruktifikation), die übrigen 8 gut bis mäßig ver-

wertet, wobei fast immer nur fortgeschrittene Fruchtkörperanlagen auftraten. Von den 17 grampositiven Bakterien waren 5 nicht, 1 sehr gut, die übrigen 11 gut bis mäßig brauchbar; dabei waren Kokken und Sarcinen günstiger als Sporenbildner. Von den 12 nicht verwertbaren Bakterien waren 9, von den 23 verwerteten nur 4 stark pigmentiert.

ANScombe und SINGH (1948) haben für eine Reihe von Bodenorganismen, die sich von lebenden Bakterien ernähren, unter anderem auch Myxobakterien, untersucht, wie weit sich bei ihnen die Nahrungsauswahl überschneidet. Durch Eintragen in ein Korrelationsquadrat kann man das auch für *Podangium erectum* und *Myxococcus virescens* ausführen. Dazu ist es nötig, die Futterorganismen in zwei Gruppen einzuteilen, in verwertbare und nicht verwertbare, wozu hier als Kriterium übereinstimmend mit SINGH die Lysisstärke herangezogen wird. Dabei muß man den Wegfall einiger positiver Ergebnisse mit in Kauf nehmen, bei denen trotz einer gewissen Entwicklung makroskopisch keine Lysis festzustellen war. Man erkennt aus dem Korrelationsquadrat, daß beide Myxobakterienarten eine sehr ähnliche Nahrungsauswahl treffen (Tab. 7).

Zur Wirkung des Futters auf die qualitativen Merkmale der Myxobakterien läßt sich kurz sagen: In allen Fütterungskulturen, in denen

Tabelle 6. Fütterung von *Podangium erectum* mit Bakterien auf reinem Agar ohne Nährstoffe. Mittelwerte aus 8 Parallelkulturen.

Nr.	Futterbakterien	Versuch											Kontrolle		
		Vegetative Entwicklung		Lysisstärke	Fruchtifikation							Vegetative Entwicklung	Fruchtifikation		
		Radius r_2 des Schwarmes nach 10 Tagen (mm)	$r_2 - r_1$		Fruchtkörperentwicklung	Stärke der Sorusbildung	Sorusdurchmesser (μ)	Stielhöhe (μ)	Cystengröße ² (μ)	Radius des Schwarmes r_2 nach 10 Tagen (mm)	Stärke der Sorusbildung				
										Mittel	Amplitude	1. Revis.	2. Revis.	1. Revis.	2. Revis.
1.	<i>Pseud. pyocyan.</i> I ¹												4	—	
2.	<i>Pseud. pyocyan.</i> II ¹												4	—	
3.	<i>Bact. radiculicola</i>	9	8—10	4	0	Anl. 2	Anl. 2			1	200	50	50	0	—
4.	<i>Pseud. tumefaciens</i>	14	6—21	14	0	keine	fert.	—	1	200	50	50	4	—	
5.	<i>Escherichia coli</i>	11	8—15	9	2	keine	Anl. 2						4	—	
6.	<i>Aerobact. aerogenes</i>	11	4—18	11	1	keine	Anl. 2						4	—	
7.	<i>Bact. prodigiosum</i> I												4	—	
8.	<i>Bact. prodigiosum</i> II												4	—	
9.	<i>Proteus vulgaris</i>	6	3—10	3	2	keine	keine						4	—	
0.	<i>Bact. ferrugineum</i>												0	—	
1.	<i>Sarcina agilis</i>	19	15—23	13	1	keine	fert.	—	1	1000	50	50	0	—	
2.	<i>Staphyloc. albus</i>	6	2—15	4	1	keine	Anl. 2						4	—	
3.	<i>Staphyloc. aureus</i>	27	17—33	14	1	Anl. 1	fert.	—	4	300	50	60	4	—	
4.	Rote Luftkokken	24	18—30	8	0—1	Anl. 2	Anl. 2						4	—	
5.	<i>Sarcina lutea</i>												4	—	
6.	Braune <i>Sarcina</i>	28	21—35	9	1—2	Anl. 2	fert.	—	1	600	50	50	0	—	
7.	<i>Bac. subtilis</i> I	10	10—10	10	0	keine	keine						4	—	
8.	<i>Bac. subtilis</i> II												4	—	
9.	<i>Bac. ellenbachensis</i>	16	8—27	14	0	keine	Anl. 2						0	—	
0.	<i>Bac. mycoides</i> I	14	9—20	12	0	keine	keine						4	—	
1.	<i>Bac. mycoides</i> II	5	2—8	5	0	keine	Anl. 2						4	—	
2.	<i>Bac. mesenter.</i> I	26	21—30	9	0—1	Anl. 2	Anl. 2						0	—	
3.	<i>Bac. mesenter.</i> II												4	—	
4.	<i>Bac. silvaticus</i>	27	25—30	12	1	Anl. 2	Anl. 2						0	—	
5.	<i>Bac. luteus</i>	16	10—25	11	0—1	keine	keine						0	—	
6.	<i>Mycobact. phlei</i>												0	—	
7.	<i>Proactin. citreus</i>												0	—	
8.	Stamm A	21	10—30	11	1	Anl. 2	Anl. 2						0	—	
9.	Stamm B	17	2—30	11	1	keine	fert.	—	4	350	—	100×60	0	—	
0.	Stamm C	10	5—15	9	1	keine	fert.	—	2	200	—	80×50	0	—	
1.	Stamm D	12	4—20	7	0—1	keine	Anl. 2						0	—	
2.	Stamm E	12	8—15	7	1	keine	Anl. 1						0	—	
3.	Stamm F	13	9—18	13	1	keine	Anl. 2						0	—	
4.	Stamm G												0	—	
5.	Stamm H												0	—	

¹ Vergleiche die entsprechenden Fußnoten zu Tab. 5!² Die Cystengröße ist in allen Tabellen auf volle 10 μ abgerundet angegeben.

eine gute Entwicklung eintrat, war die Farbstoffproduktion im vegetativen Schwarm sehr kräftig, am stärksten war sie im direkten Futterbereich. Während bei *Myxococcus virescens* stets der gleiche grüngelbe Farbton in verschiedener Intensität auftrat, zeigten die *Podangium*-Schwärme je nach Futter gelbe, rötliche oder hellbraune Färbung. Bei den Fruchtkörpern war die Färbung normal (bei *Myxococcus virescens* gelbgrün, bei *Podangium erectum* braun), sie schwankte nur leicht in der Intensität. Die Ausbildung der Form wurde dagegen stärker durch das Substrat beeinflusst. So traten bei *Myxococcus virescens* mit einigen Futterbakterien nur runde Fruchtkörper auf, während in den meisten Fällen neben runden viele wulstige vorhanden waren. Bei *Podangium erectum* war wohl auch die so häufig auftretende Bildung fortgeschrittener Fruchtkörperanlagen ohne endgültige Formung eine Wirkung der Futterbakterien; die fertigen Fruchtkörper waren rund, zylindrisch oder keulig und je nach dem Futter verschieden.

Tabelle 7. Verhalten von *Podangium erectum* und *Myxococcus virescens* gegenüber den gleichen 35 Futterbakterienstämmen.

		Für <i>Myxococcus virescens</i>		Summe
		nicht verwertbare Futterbakterien	verwertbare Futterbakterien	
Für <i>Podangium erectum</i>	nicht verwertbare Futterbakterien	10	8	18
	verwertbare Futterbakterien	2	15	17
	Summe	12	23	35

Hinsichtlich des Bakterienfutters gilt also für beide Myxobakterienarten: Es konnten gramnegative und grampositive Bakterien verwertet werden, von den letzteren die Sporenbildner weniger gut. Die pigmentierten Stämme waren häufig schlechter verwertbar als unpigmentierte. Während entsprechend der Lysisstärke *Myxococcus virescens* sich mit vielen Futterorganismen kräftig vegetativ entwickelte und gut fruktifizierte, kam es bei *Podangium erectum* nur mit wenigen Futterorganismen zu einer normalen Fruktifikation. Die Lysisstärke entsprach nicht immer der Entwicklung.

β) Hefen als Futterorganismen.

Die Hefen wurden nicht nur zur Fütterung von *Myxococcus virescens* und *Podangium erectum*, sondern auch von *Myxococcus fulvus* und *M. stipitatus* benutzt (s. Tab. 8). Die Durchführung entspricht dem vorhergehenden Versuch.

Auch Hefen können als Futterorganismen verwertet werden. Die Zahl der brauchbaren Hefen und die Entwicklungsstärke schwankte allerdings bei den verschiedenen Myxobakterienarten

Tabelle 8. Fütterung von *Myxococcus virescens*, *M. fulvus*, *M. stipitatus* und *Podanigium erectum* mit Hefen auf reinem Agar ohne Nährstoffsatz. Mittelwerte aus 8 Parallelkulturen.

Myxobakterium	Hefe	Versuch										Kontrolle	
		Vegetative Entwicklung		Lysisstärke	Fruchtifikation							Vegetative Entwicklung	Fruchtifikation
					Fruchtkörperentwicklung	Stärke der Sorus- oder Fruchtkörperbildung		Sorusdurchmesser (μ)	Stielhöhe (μ)	Cysten- oder Fruchtkörpergröße (μ)			
		Mittel	Amplitude			$r_2 - r_1$	1. Revis.				2. Revis.		
<i>M. virescens</i>	<i>Torula aurantica</i>	8	5—11	1		fert.		2—3		100	7	—	
	Hefe Saaz										7	—	
	Hefe Froberg										7	—	
	Weinhefe										7	—	
	<i>Torulopsis utilis</i>	11	11—12	0		fert.		1		150	7	—	
	<i>Mycoderma valida</i>										7	—	
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>										7	—	
	<i>Zygosaccharom. spec.</i>										7	—	
	<i>Candida reukaufii</i>	7	5—8	0		keine					7	—	
<i>M. fulvus</i>	<i>Saccharom. gracilis</i>	6	3—10	1		fert.		1		100	7	—	
	<i>Torula aurantica</i>	18	16—20	1		fert.		4		100	16	1	
	Hefe Saaz	9	4—13	1		fert.		2		1000 × 100	16	1	
	Hefe Froberg	20	18—21	1		fert.		4		150	16	1	
	Weinhefe	9	5—15	1		fert.		2		100	16	1	
	<i>Torulopsis utilis</i>										16	1	
	<i>Mycoderma valida</i>										16	1	
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>										16	1	
	<i>Zygosaccharom. spec.</i>										16	1	
<i>M. stipitatus</i>	<i>Candida reukaufii</i>	3	1—6	1		Anl. 1					16	1	
	<i>Saccharom. gracilis</i>	10	10—10	1		fert.		2		1000 × 100	16	1	
	<i>Torula aurantica</i>	8	5—10	7	0	fert.	fert.	1	1		100	4	—
	Hefe Saaz	8	5—12	5	1	keine	fert.	—	1		100	4	—
	Hefe Froberg	9	6—11	9	0—1	keine	keine				4	—	
	Weinhefe	8	5—13	6	0—1	keine	fert.	—	1—2		100	4	—
	<i>Torulopsis utilis</i>	5	4—6	2	1	keine	keine				4	—	
	<i>Mycoderma valida</i>	12	9—17	6	1	fert.	fert.	1	2		100	4	—
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	11	8—14	4	1	Anl. 2	fert.	—	1		100	4	—
<i>M. stipitatus</i>	<i>Zygosaccharom. spec.</i>	8	3—10	5	0—1	keine	keine				4	—	
	<i>Candida reukaufii</i>	9	5—15	5	0	keine	keine				4	—	
	<i>Saccharom. gracilis</i>	10	6—14	6	1	keine	fert.	—	1—2		50	4	—

Tabelle 8 (Fortsetzung).

Myxobakterium	Hefe	Versuch												Kontrolle	
		Vegetative Entwicklung				Lysistärke	Fruchtifikation							Vegetative Entwicklung	Fruchtifikation
		Radius r_2 des Schwarmes nach 10 Tagen (mm)		1. Revis.	2. Revis.		1. Revis.	2. Revis.	Sorusdurchmesser (μ)	Stielhöhe (μ)	Cysten- oder Fruchtkörpergröße (μ)				
		Mittel	Amplitude									Fruchtkörperentwicklung	Stärke der Sorus- oder Fruchtkörperbildung		
<i>Podangium erectum</i>	<i>Torula aurantica</i>	19	15—25	10	1	Anl. 1	fert.	—	1	700		200 × 100	0	—	
	Hefe Saaz	3	1—6	3	1	keine	Anl. 2						0	—	
	Hefe Froberg	4	2—7	3	0—1	keine	keine						0	—	
	Weinhefe												0	—	
	<i>Torulopsis utilis</i>												0	—	
	<i>Mycoderma valida</i>	7	2—15	5	1	keine	Anl. 1						0	—	
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>												0	—	
	<i>Zygosaccharom. spec.</i>												0	—	
	<i>Candida reukaufii</i>												0	—	
	<i>Saccharom. gracilis</i>	3	1—5	3	1	keine	keine						0	—	

sehr. Geht man von der Entwicklung im Vergleich zur Kontrolle aus, so waren von den 10 Hefestämmen für *Podangium erectum* 5 nicht, 5 mäßig bis gut, für *Myxococcus virescens* 7 nicht, 3 mäßig bis gut, für *M. fulvus* 5 nicht, 5 mäßig bis gut und für *M. stipitatus* alle 10 mäßig bis gut verwertbar. Die Nahrungsauswahl überschneidet sich dabei nur teilweise: 2 von den 10 Hefestämmen waren für alle 4 Myxobakterien-Arten brauchbar (läßt man *Myxococcus virescens* weg, so ergibt sich für die 3 restlichen Arten eine stärkere Korrelation: 4 Hefestämme waren für alle verwertbar). Auffällig war eine große Zahl nicht angegangener Impfungen: nur bei *Myxococcus stipitatus* traten weniger Ausfälle einzelner Parallelkulturen auf. Die vegetative Entwicklung war meistens nicht sehr kräftig, was offenbar mit relativ spätem Einsetzen des Wachstums der Myxobakterien zusammenhängt. (Diese Vermutung ergibt sich aus den Untersuchungen an *M. stipitatus* und *Podangium*, wo eine Revision nach 5 und 10 Tagen stattfand. Bei diesen Kulturen entfiel der größere Anteil des Wachstums auf die Spanne zwischen 1. und 2. Revision). Die Schleimbildung war dagegen in allen Fällen recht gut. Die Fruktifikation setzte bei den Myxokokken fast bei jedem brauchbaren Futter gut ein, während bei *Podangium erectum* nur bei einem Hefefutter wenige normale Fruchtkörper vorhanden waren.

Das interessanteste Ergebnis ist wohl, daß die Wirkung der Myxobakterien auf die Hefezellen ebenfalls lytisch war. Da die Membran der Hefezellen weder aus Chitin noch Cellulose besteht, sondern unter anderem aus Proteiden, ist diese Tatsache bei den proteolytischen Fähigkeiten der Myxobakterien nicht überraschend. Man konnte deutlich schon makroskopisch ein Verschwinden der Hefezellen im Schwarmbereich erkennen, so daß auch hier ein „Loch“ in dem vorher gleichmäßigen Ausstrich auftrat (Abb. 10). Mikroskopisch stellt sich die Grenze des Schwarmes als eine scharfe Linie zwischen zerstörten und intakten Hefezellen dar. Wie bei der Lysis der Bakterienzellen ging auch hier die Zerstörung niemals über den Bereich des Schwarmes hinaus. Im Schwarmbereich waren von Zellen mit undeutlichen Umrissen bis zu winzigen Frag-



Abb. 10.

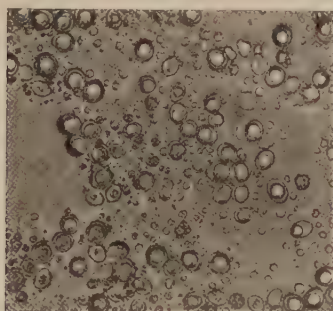


Abb. 11.

Abb. 10. *Podangium erectum*, Fütterung mit Hefe Saaz auf reinem Agar. Ursprünglich rechteckiger Hefeausschlag zum Teil gelöst, Rest: helle Fläche oben. Im Schwarmbereich sieht man eigenartige Schleimwülste in mehreren Ringen konzentrisch angeordnet an Stelle normaler Sori. $2,5\times$.

Abb. 11. *Myxococcus virescens*, Fütterung mit *Candida reukauffii* auf reinem Agar. Neben noch intakten Hefezellen sieht man die Trümmer von angegriffenen. Zwischen den Hefezellen undeutlich die Myxobakterienstäbchen. $280\times$.

menten alle Stadien angegriffener Hefezellen vorhanden (Abb. 11). Allerdings kam es in keinem der untersuchten Fälle zu einem Verschwinden aller Zellen wie bei Bakterienfutter.

Die Farbstoffbildung der vegetativen Schwärme war bei allen Arten bis auf *Podangium erectum* schwach; bei diesem traten gelbe und rote Farbtöne auf. Auch bei den Fruchtkörpern schwankte die Färbung (braun bei *Podangium erectum*, gelbgrün bei *Myxococcus virescens*, ziegelrot bei *M. fulvus* und blaßviolett bei *M. stipitatus*) nur leicht in der Intensität. Die Form der Fruchtkörper hingegen wurde durch das Substrat in mehreren Fällen beeinflußt: Während bei *Myxococcus virescens* mit Hefefutter nur runde Fruchtkörper auftraten, bildete *M. fulvus* mehr wulstige; meistens lagen die Verhältnisse umgekehrt. Bei

M. stipitatus unterblieb bei allen Hefefütterungen die Bildung der Stiele; es saßen nur runde Fruchtkörper auf einer gemeinsamen Schleimmasse oder der Schleimklumpen zeigte nur bucklige Auswüchse ohne bestimmte Formung. Die fertigen Fruchtkörper von *Podangium erectum* waren zylindrisch; bei Fütterung mit Hefe *Saaz* gab es einen merkwürdigen Effekt: Die Fruchtkörperanlagen, die sich hier nicht zu endgültigen Cysten formten, traten als konzentrische Schleimwülste auf (Abb. 10).

Ein Teil der geprüften Hefestämme ermöglichte den Myxobakterien also mäßige bis gute Entwicklung, wobei die Hefezellen getötet und gelöst wurden.

γ) *Phlyctochytrium* spez. (*Phycomycet*) als Futterorganismus.

Als erster Schritt zur Prüfung von Phycomyceten als Futter wurde ein *Phlyctochytrium*¹ benutzt, das sich wegen seiner Wuchsform mit der gleichen Methode wie Bakterien und Hefen testen ließ. Es wurde zur Fütterung von *Podangium erectum*, *Myxococcus virescens* und *M. fulvus* verwendet. Die drei Myxobakterien-Arten entwickelten sich vegetativ gut (große Schwärme mit guter Schleimproduktion), bei *Myxococcus virescens* und *M. fulvus* kam es außerdem zu sehr starker Fruktifikation. Die Fruchtkörper waren normal gefärbt (gelbgrün bei *Myxococcus virescens*, ziegelrot bei *M. fulvus*), die Form war bei *M. virescens* wie üblich rund bis wulstig; *M. fulvus* bildete dagegen runde gestielte Fruchtkörper.

Der Pilz verschwand unter der Einwirkung der Myxobakterien nicht, aber mikroskopische Untersuchungen und Abimpfungen auf Pepton-Malz-Agar zeigten deutlich eine große Anzahl zerstörter Pilzzellen neben noch intakten.

Die untersuchten Myxobakterien konnten sich also mit *Phlyctochytrium* z. T. sehr gut entwickeln, wobei es zu einer Schädigung des Pilzes kam.

δ) *Algen* als Futterorganismen.

Die Versuchsanordnung entspricht den beiden vorhergehenden Versuchen. Die Algen wurden als Futter für *Podangium erectum*, *Myxococcus virescens* und *M. fulvus* geprüft. Die Versuche wurden im dunklen Thermostaten gemacht. Da die Algen im Dunkeln ihre Photosynthese einstellen müssen, wurden entsprechende Verhältnisse wie bei den vorhergehenden Versuchen geschaffen, wo das Futter auf dem reinen Agar keine Nährstoffe vorfand. In beiden Fällen konnte es nur noch zu einer geringen Vermehrung auf Grund der in den Zellen vorhandenen Reservesubstanzen kommen. Die Stammkulturen von *Hormidium flaccidum* gingen leider während der Versuche ein, *Myxococcus fulvus* und *Podangium erectum* konnten daher nicht mehr mit dieser Art, sondern nur mit den übrigen sieben Algen geprüft werden (siehe Tab. 9).

Auch bei der Fütterung mit absoluten Reinkulturen von Grünalgen trat in gewissen Fällen Entwicklung der Myxobakterien ein (Tab. 9).

¹ Die Reinkultur stammte aus dem Pflanzenphysiologischen Institut Göttingen.

Tabelle 9. Fütterung von *Myxococcus virescens*, *M. fulvus* und *Podangium erectum* mit Algen auf reinem Agar ohne Nährstoffzusatz. Mittelwerte aus 8 Parallelkulturen.

Alge	Versuch												Kontrolle	
	Vegetative Entwicklung			Lysisstärke $r_3 - r_1$	Fruchtifikation								Vegetative Entwicklung r_3 nach 10 Tagen (mm)	Fruchtifikation Stärke der Sorus- oder Fruchtkörperbildung
	Mittel	Amplitude	Radius r_2 des Schwarmes nach 10 Tagen (mm)		Fruchtkörperentwicklung		Stärke der Sorus- oder Fruchtkörperbildung		Sorusdurchmesser (μ)	Stielhöhe (μ)	Cysten- oder Fruchtkörpergröße (μ)			
					1. Revis.	2. Revis.	1. Revis.	2. Revis.						
<i>Stichococcus bacillaris</i>	4	3—7	0	1	keine	keine							5	—
<i>Stichococcus mirabilis</i>	5	4—5	2	1	keine	keine							5	—
<i>Pediastrum tetras</i>	9	6—11	3	0	keine	keine							4	—
<i>Scenedesmus Naegelii</i>	8	3—13	4	0—1	keine	fert.		2			100		4	—
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	10	5—14	5	0	keine	fert.		2			100		4	—
<i>Hormidium Barlowi</i>	11	7—13	4	0	keine	keine							4	—
<i>Hormidium flaccidum</i>	12	7—16	8	0—1	keine	fert.		1—2			100		4	—
<i>Chlamydomonas eugametos</i>	5	3—8	3	1	keine	Anl. 1							5	—
<i>Stichococcus bacillaris</i>	8	5—10	1	0—1	keine	keine							11	—
<i>Stichococcus mirabilis</i>	16	12—18	5	1	Anl. 1	fert.		2—4			100		11	—
<i>Pediastrum tetras</i>	12	10—15	6	0	keine	fert.		1			100		11	—
<i>Scenedesmus Naegelii</i>	17	10—21	9	0—1	keine	fert.		2—3			150		11	—
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	14	10—16	4	0	keine	keine							11	—
<i>Hormidium Barlowi</i>	15	12—17	5	0	keine	keine							11	—
<i>Chlamydomonas eugametos</i>	16	12—20	5	0—1	keine	keine							11	—
<i>Stichococcus bacillaris</i>	5	2—6	3	1	fert.	fert.	1	1	300		100×60		0	—
<i>Stichococcus mirabilis</i>	10	2—16	5	1	Anl. 2	Anl. 2							0	—
<i>Pediastrum tetras</i>													0	—
<i>Scenedesmus Naegelii</i>													0	—
<i>Scenedesmus quadricauda</i>													0	—
<i>Hormidium Barlowi</i>													0	—
<i>Chlamydomonas eugametos</i>	6	2—9	5	0—1	keine	keine							0	—

Sie war vegetativ allerdings nicht sehr kräftig, mit Ausnahme der guten Schleimbildung; die beiden *Myxococcus*-Arten fruktifizierten aber gut (Abb. 12, 13); bei *Podangium erectum* setzte dagegen nur in einem Falle eine geringe normale Fruktifikation ein. Im Gegensatz zu den Fütterungen

mit Hefen traten nur selten Ausfälle einzelner Parallelkulturen ein. Der größere Teil des Wachstums erfolgte hier bereits — wie auch bei den Versuchen mit Bakterien — vor der ersten Kontrolle, also während der ersten 5 Tage. Auf Grund der Entwicklungsstärke bei Algenfütterung gegenüber den algenfreien Kontrollen erwiesen sich von den 8 geprüften Algen für *Myxococcus virescens* 2 nicht, 6 mäßig bis gut verwertbar, von den 7 geprüften Algen für *M. fulvus* 1 nicht, 6 mäßig bis sehr gut und für *Podangium erectum* 4 nicht, 3 mäßig bis gut brauchbar. Die Ausnutzbarkeit des Futters war nur bei den beiden *Myxococcus*-Arten sehr ähnlich, von 8 Algenarten waren 5 für beide verwertbar.



Abb. 12.

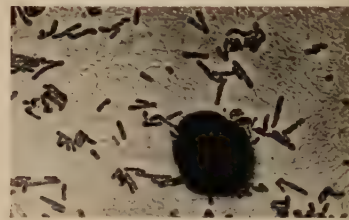


Abb. 13.

Abb. 12. *Myxococcus fulvus*, Fütterungsversuch mit *Scenedesmus Naegelii* auf reinem Agar. Die gute Entwicklung der Myxobakterien kann man an der reichlichen Fruktifikation erkennen. 2 ×.

Abb. 13. *Myxococcus virescens*, Fütterungsversuch mit *Hormidium flaccidum* auf reinem Agar. Ein Fruchtkörper und zahlreiche Stäbchen zwischen den groben Algenzellen. 75 ×.

Die Wirkung der Myxobakterien auf die Algenzellen war nicht einheitlich. Makroskopisch hob sich das Schwarmgebiet aus dem lebhaft grünen Ausstrich meistens durch etwas hellere Färbung und anscheinend dünnere Lagerung der Algen heraus. Mikroskopisch konnten bei den *Stichococcus*-Arten und bei *Chlamydomonas*, in geringerem Umfang auch bei *Scenedesmus Naegelii* deutlich angegriffene, nie aber völlig zerstörte Zellen erkannt werden. Die angegriffenen Zellen (Abb. 14) hatten unscharfe Umrisse, waren nicht mehr lebhaft grün und kleiner als die Zellen der Kontrollen. Diese Einwirkung auf die Algenzellen, die den Eindruck erweckt, als seien deren Zellmembranen aufgelöst, ist deswegen unerwartet, weil es sich hier ja um Cellulosemembranen¹ handelt, und wenigstens die *Myxococcaceen* nach allen Literaturangaben (mit Ausnahme von BEEBE 1943) Cellulose nicht verwerten können. Andererseits ist in diesem Zusammenhang die Arbeit von GEITLER (1924/25) interessant, der eine *Polyangium*-Art beschrieben hat, die parasitisch auf *Cladophora* leben soll. Während bei *Pediastrum tetras* und *Scenedesmus quadricauda* keine Einwirkung der Myxobakterien auf die Zellgestalt

¹ Genauere Untersuchungen der Membranen wurden leider nicht vorgenommen.

beobachtet wurde, waren bei den *Hormidium*-Arten (Abb. 15, 16) die langen Algenfäden im Schwarmbereich in kurze Stückchen zerfallen mit undeutlichen Zellgrenzen¹. Da bei der Wirkung der Myxobakterien auf die Algen nicht eine deutliche Lysis mit völligem Verschwinden der Zellen eintrat, kann man hier nicht — wie bei den vorigen Versuchen mit großer Wahrscheinlichkeit — beurteilen, ob die Entwicklung der Myxobakterien zum größten Teil durch Substanzen der Algenzellen selbst oder nur durch von ihnen ausgeschiedene Stoffe zustande kam.

Die Farbstoffbildung der vegetativen Schwärme unterblieb bei diesen Versuchen ganz; die Fruchtkörper waren normal, ohne große Abweichungen gefärbt (bei *Myxococcus virescens* gelbgrün, bei *M. fulvus* ziegelrot, bei *Podangium erectum* braun). Bei den *Myxococcus*-Arten herrschten runde, bei *Podangium erectum* keulige Fruchtkörper vor.

Von den geprüften Algen gestatteten also sowohl planktische wie terrestrische den Myxobakterien die Entwicklung, zum Teil bis zur Fruchtkörperbildung.

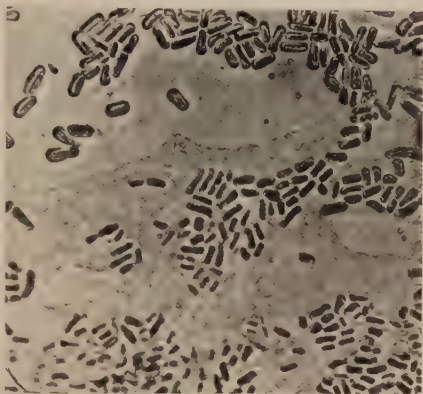


Abb. 14. *Podangium erectum*, Fütterung mit *Stichococcus mirabilis* auf reinem Agar. Im Bereich des undeutlich erkennbaren Schwarmes haben die Algenzellen unschärfere Umrisse und sind kleiner als die nicht angegriffenen Algenzellen in der oberen Hälfte des Bildes. 330 ×.

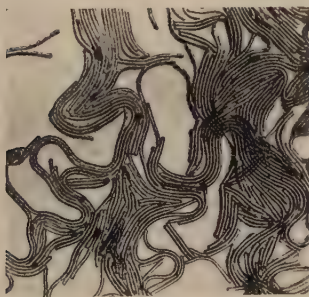


Abb. 15.

Abb. 15. *Hormidium Barlowi*, parkettartige Lagerung der langen Algenfäden im durch Myxobakterien nicht beeinflussten Zustand. 100 ×.

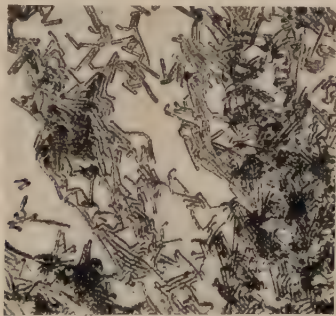


Abb. 16.

Abb. 16. *Myxococcus virescens* mit *Hormidium Barlowi* auf reinem Agar. Im Schwarmgebiet unregelmäßig verteilte kurze Fäden. 100 ×.

¹ Nach unveröffentlichten Versuchen von BRIGITTE SCHRÖDER tritt ein Zerfall der *Hormidium*-Fäden in ihre Einzelzellen auch unter der Wirkung gewisser Ionen ein (erscheint demnächst in dieser Zeitschrift).

b) Ernährung durch Kombination von organischen Nährböden mit Futterorganismen (Bakterien).

Nach der Feststellung, daß sich die Myxobakterien mit nur einem Futterorganismus allein ohne weitere Nährstoffe entwickeln können, sollte durch die folgenden Versuche eine Annäherung an natürliche Verhältnisse versucht werden, indem die Myxobakterien mit Futterbakterien auf organische Nährböden gebracht wurden (als Kontrolle dienten dieselben Fütterungsversuche auf reinem Agar).

Die Versuchsanordnung entspricht der bereits geschilderten weitgehend. Neben reinem Agar wurden als Nährböden benutzt: Probacit-Agar, Hefe-Mist-Agar (1 g Kaninchenmist + 0,5 g Hefe auf 100 cm³ Wasser) und Kartoffeldekot-Agar. Futterorganismen waren *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus*. Von jedem Futterbakterium wurden auf jedem Substrat vier Ausstriche angelegt, und zwar in einer PETRI-Schale zwei kleine, kreisförmige (geringe Futtermenge) und in einer anderen PETRI-Schale zwei größere rechteckige (große Futtermenge). In die Mitte aller Futterausstriche und dazu auf jedem Boden als Kontrolle allein wurden *Myxococcus virescens* und *Podangium erectum* geimpft. Zur Beurteilung der Entwicklung der Futterbakterien auf den verschiedenen Böden wurden außerdem Ausstriche der beiden Bakterien ohne Myxobakterien-Beimpfung angelegt.

Im wesentlichen sahen die Fütterungsversuche auf den organischen Nährböden nicht anders aus als die auf reinem Agar. Allerdings hatten sich die Futterbakterien-Austriche auf den Nährböden vergrößert, am stärksten auf Probacit-Agar, jedoch nur gering im Verhältnis zur Myxobakterienausbreitung. Die Lysis war gut zu erkennen und hatte in vielen Fällen, besonders bei den kreisförmigen Futterausstrichen zum Verschwinden des Futters geführt. Auf Probacit-Agar mit Futterzusatz trat keine Myxobakterienentwicklung ein (siehe Tab. 10). *Podangium erectum* wächst auf diesem Boden auch ohne Futter nicht, *Myxococcus virescens* dagegen wohl, aber nur vegetativ, so daß hier der Futterzusatz also hemmend wirkte. Auf den drei anderen Substraten kam es bei Futterzusatz zu sehr guter Entwicklung und kräftiger Schleimbildung (diese besonders auf Kartoffel-Agar) bei beiden Myxobakterien, wobei die Ergebnisse bei den kleinen kreisförmigen Ausstrichen und den größeren im Durchschnitt gleich waren, so daß das Futter nicht einfach quantitativen Einfluß hatte. Während die Entwicklung von *Myxococcus virescens* in den Fütterungsversuchen auf organischen Nährböden sich nicht sehr von der auf reinem Agar unterschied, zeigte sich bei *Podangium* eine sehr viel üppigere Fruktifikation auf den organischen Nährböden, besonders auf dem Kartoffeldekot-Agar: hier war auch kräftiger Stärkeabbau festzustellen. In den vorhergehenden Versuchen hatten nur wenige Futterorganismen zu guter Fruktifikation bei *Podangium* geführt, auf Hefe-Mist- und auf Kartoffeldekot-Agar mit Futterbakterien trat sie dagegen äußerst reichlich ein (siehe Abb. 1). Hier haben also wohl neben den Lysisprodukten noch andere Stoffe, nämlich Stoffwechselprodukte

Tabelle 10. Fütterung von *Myxococcus virescens* und *Podangium erectum* mit Bakterien auf organischen Nährböden. Mittelwerte aus 4 Parallelkulturen.

Organisches Nährsubstrat	Futterbakterium	Art des Zusatzes	Vegetative Entwicklung			Lysisstärke	Fruchtifikation						
			Radius r_3 des Schwarmes nach 10 Tagen (mm)		$t_2 - t_1$		Fruchtkörperentwicklung		Stärke der Sorus- oder Fruchtkörperbildung		Sorusdurchmesser (μ)	Stielhöhe (μ)	Cysten- oder Fruchtkörpergröße (μ)
			Mittel	Amplitude			1. Revis.	2. Revis.	1. Revis.	2. Revis.			
Reiner Agar	<i>E. coli</i>	R ¹	16	15—17	6	2	keine	keine					
"	"	K ²	14	12—15	5	2	Anl. 2	fert.	2				100
"	<i>St. aur.</i>	R	19	18—20	6	1	Anl. 2	fert.	1				100
"	"	K	14	13—15	5	1	Anl. 2	fert.	2—3				100
"	—	—	9	8—10	4	—	Anl. 2	fert.	1				50
Probacit-Agar	<i>E. coli</i>	R											
"	"	K											
"	<i>St. aur.</i>	R											
"	"	K											
"	—	—	6	4—8	2	—	keine	keine					
Hefe-Mist-Agar	<i>E. coli</i>	R	17	17—17	0	2	keine	Anl. 2					
"	"	K	7	5—8	2	2	keine	Anl. 2					
"	<i>St. aur.</i>	R	20	18—22	7	1	keine	fert.	2				100
"	"	K	15	14—16	6	1—2	keine	fert.	2				100
"	—	—	10	10—10	3	—	keine	Anl. 1					
Kartoffel-Agar	<i>E. coli</i>	R	12	8—16	7	2	Anl. 2	fert.	2				100
"	"	K	16	15—16	7	1	Anl. 1	Anl. 2					
"	<i>St. aur.</i>	R	22	22—22	8	1	keine	fert.	3				100
"	"	K	25	23—27	10	1—2	Anl. 2	fert.	2				100
"	—	—	19	18—20	10	—	keine	fert.	1				50
Reiner Agar	<i>E. coli</i>	R	18	15—20	7	1	keine	Anl. 1					
"	"	K	23	20—25	10	2	Anl. 1	Anl. 2					
"	<i>St. aur.</i>	R	24	22—26	7	1	keine	Anl. 2					
"	"	K	15	15—15	2	1	keine	Anl. 2					
"	—	—											
Probacit-Agar	<i>E. coli</i>	R											
"	"	K											
"	<i>St. aur.</i>	R											
"	"	K											
"	—	—											
Hefe-Mist-Agar	<i>E. coli</i>	R	12	11—13	0	2	Anl. 2	fert.	1	700	100		20
"	"	K	10	9—11	2	2	fert.	fert.	1	700	100		40
"	<i>St. aur.</i>	R	18	17—19	2	1	Anl. 2	fert.	2	700	50		60
"	"	K	14	13—15	5	1—2	fert.	fert.	1	3	700	50	60
"	—	—	12	11—13	2	—	keine	fert.	1	300	—		30 × 60
Kartoffel-Agar	<i>E. coli</i>	R	20	20—20	8	2	keine	fert.	3	700	—		50 × 80
"	"	K	12	8—15	3	2	fert.	fert.	2	3	500	30	60
"	<i>St. aur.</i>	R	25	25—25	7	1	keine	fert.	1	700	100		30
"	"	K	35	35—35	11	1—2	keine	fert.	3	600	50		60
"	—	—	8	5—10	6	—	fert.	fert.	1	300	40		30

¹ R = rechteckiger Ausstrich.² K = kreisförmiger Ausstrich.

des Futters oder Substanzen der Nährböden, zu dieser guten Wirkung geführt.

Die Farbstoffbildung der vegetativen Schwärme war sehr kräftig, bei *Myxococcus virescens* trat der grüngelbe Farbton in verschiedenen Intensitäten auf, bei *Podangium erectum* kamen gelbe, rötliche und braune Farbtöne vor. Form und Farbe der Fruchtkörper blieben bei *Myxococcus virescens* unter allen Bedingungen fast gleich, bei *Podangium erectum* dagegen traten besondere Effekte ein: Auf Hefe-Mist-Agar waren seine Fruchtkörper normal, auf dem Kartoffeldekot-Agar aber waren sie bei beiden Futtersorten gelbrot gefärbt; die Fruchtkörper der Kontrolle ohne Futter auf Kartoffelboden hatten dagegen die normale braune Farbe. Sowohl die rötlichen wie die braunen Farbtöne traten in sehr verschiedenen Intensitäten auf. Die Form der fertig ausgestalteten Sori zeigte bei den Kombinationen auf Mist- und Kartoffel-Agar die größten Abwandlungen, die während der ganzen Untersuchung überhaupt beobachtet wurden, sie ließen sich jedoch nicht auf bestimmte Faktoren zurückführen. Auf Mist-Agar mit *Escherichia coli* als Futter erschienen neben ganz normalen Sori mit runden gestielten oder keuligen Fruchtkörpern solche, bei denen alle Fruchtkörper winzige Cysten mit extrem langen Stielen hatten und bei denen die Oberfläche wie eingeschrumpft aussah. Mit *Staphylococcus aureus* als Futter auf Mist-Agar traten neben vielen normalen auch einige Sori auf, die nur aus breiten hellbraunen Stielen ohne Cysten bestanden.

Die Kombination organischer Nährböden mit lebendem Bakterienfutter führte also unter den gewählten Bedingungen bei *Myxococcus virescens* zu keiner Steigerung der Entwicklung gegenüber der Fütterung auf nährstoffreiem Substrat; bei *Podangium erectum* trat dadurch jedoch sehr viel üppigere Fruktifikation, verbunden mit starker Abweichung der qualitativen Merkmale, ein.

c) Mehrere Futterorganismen auf reinem Agar.

Eine Annäherung an natürliche Verhältnisse wurde außerdem durch die gleichzeitige Verwendung von mehreren Futterbakterien versucht. Damit nicht zu viele Faktoren beteiligt waren, wurde als Substrat reiner Agar ohne Nährsalze und organische Zusätze benutzt. *Myxococcus virescens* wurde teils mit einer Mischung von je 2 Futterbakterien, teils aber auch mit einer Mischung der Stämme A—E zusammengeimpft, die alle aus Rohkulturen von *Podangium erectum* isolierte Bakterien sind. Auch *Podangium erectum* wurde anschließend mit der Mischung der Stämme A—E getestet. Zum Vergleich diente die Verfütterung von jedem Futterorganismus allein an das betreffende Myxobakterium.

Die Versuchsanordnung war wie bei den vorhergehenden Versuchen. Für die Fütterung der Myxobakterien mit zwei Futterorganismen wurde von beiden der Inhalt von je 3 Platinösen untereinander vermischt und ausgestrichen. Dieser Ausstrich wurde mit Myxobakterien zentral beimpft. Für die Vergleichskulturen mit nur einem Futterorganismus wurden sechs Ösen von diesem ausgestrichen. Für die Mischung der 5 Stämme A—E wurde von jedem der Inhalt einer Öse, für die Vergleichskulturen mit je einem Stamm 5 Ösen ausgestrichen.

α) Fütterung mit definierten Bakterienstämmen.

Bei den Fütterungsversuchen 1, 2, 6 und 8 der Tab. 11 wurden jeweils zwei Futterbakterien gemischt, von denen jedes allein für *Myxococcus virescens* verwertbar ist.

Dabei handelt es sich bei Nr. 6 um zwei gramnegative, bei Nr. 8 um zwei grampositive Futterbakterien, bei Nr. 1 um ein gramnegatives und ein grampositives, nicht sporenbildendes und bei Nr. 2 um ein gramnegatives und ein grampositives, sporenbildendes Futterbakterium.

Die Fütterung ergab bei 1 eine Förderung des vegetativen Wachstums wie der Fruktifikation gegenüber der Fütterung mit nur einem der Partner. Bei 2, 6 und 8 lag das Ergebnis zwischen dem der Fütterung mit jedem einzelnen der beiden Partner.

Bei den Versuchen 3, 4, 5, 7 und 9 wurden jeweils zwei Futterbakterien geboten, von denen das eine allein verwertbar, das andere nicht verwertbar war.

Es handelt sich bei Nr. 3 und Nr. 4 um zwei gramnegative, bei Nr. 9 um zwei grampositive Futterbakterien, bei Nr. 5 und Nr. 7 um ein grampositives und ein gramnegatives Bakterium, wobei einmal das gramnegative verwertbar, das andere nicht verwertbar war und umgekehrt.

Die Impfung führte bei 4 und 9 zu einer völligen Hemmung der Entwicklung, bei 3 und 7 zu einer geringeren Entwicklung als mit dem verwertbaren Partner allein und bei 5 überraschenderweise zu einer zwar vegetativ etwas schlechteren, aber hinsichtlich der Fruktifikation besseren Entwicklung als mit dem verwertbaren Partner allein.

Bei den qualitativen Merkmalen traten keine besonderen Erscheinungen auf, Form (rund bis wulstig) und Farbe (gelb-grün) zeigten nur geringe Schwankungen.

Der Einfluß des zweiten anwesenden Futterbakteriums machte sich also meistens deutlich bemerkbar, wobei zwar häufig die Entwicklungsstärke bei gemischtem Futter zwischen den für die Komponenten charakteristischen Entwicklungsstärken lag, in einigen Fällen aber auch ganz unerwartete Ergebnisse auftraten.

β) Fütterung mit den nicht bestimmten Bakterienstämmen aus der natürlichen Umgebung der Myxobakterien.

Alle Stämme hatten bei Einzelverfütterung bei *Myxococcus virescens* sehr gute Wirkung auf die vegetative wie fruktifikative Phase (Tab. 12). Durch Kombination aller 5 Stämme miteinander wurde die

Tab. 11. Fütterung von *Myxococcus virescens* mit einer Mischung von 2 Futterbakterien auf reinem Agar. Mittelwerte aus 4 Parallelkulturen.

Nr.	Futterbakterien	Vegetative Entwicklung			$r_2 - r_1$	Lysistärke	Fruchtifikation					
		Radius r_2 des Schwarmes nach 10 Tagen (mm)		Fruchtkörperentwicklung			Stärke der Fruchtkörperbildung		Fruchtkörpergröße (μ)			
		Mittel	Amplitude				1. Revis.	2. Revis.		1. Revis.	2. Revis.	
1	<i>Proteus vulgaris</i>	12	12—12	9	2	keine	fert.		2	1000 × 50		
	<i>Staphylococcus aureus</i> .	13	12—14	12	1	keine	fert.		2	150		
	<i>Prot. vulg.</i> + <i>Staph. aur.</i>	22	13—31	16	1	Anl. 2	fert.		4	100		
	Kontrolle ohne Futter .	5	4—6	4		keine	keine					
2	<i>Escherichia coli</i>	20	18—22	11	2	keine	fert.		2	100		
	<i>Bacillus subtilis</i> I . . .	13	12—14	7	0	keine	fert.		1	150		
	<i>E. coli</i> + <i>Bac. subt.</i> . . .	14	13—15	8	1	keine	fert.		2	150		
	Kontrolle ohne Futter .	11	7—15	8	—	keine	keine					
3	<i>Escherichia coli</i>	17	12—22	11	2	Anl. 2	fert.		4	150		
	<i>Pseudomonas pyocyan.</i> I											
	<i>E. coli</i> + <i>Pseud. pyoc.</i> .	7	7—7	4	1	Anl. 2	fert.		1	150		
	Kontrolle ohne Futter .	14	14—14	9	—	keine	keine					
4	<i>Escherichia coli</i>	19	18—20	6	2	Anl. 2	fert.		3	150		
	<i>Bacterium prodigiosum</i> I											
	<i>E. coli</i> + <i>Bact. prod.</i>											
	Kontrolle ohne Futter .	12	12—12	9	—	keine	keine					
5	<i>Bacterium prodigiosum</i> I											
	<i>Bacillus subtilis</i> I . . .	33	31—35	25	0	keine	fert.		2	100		
	<i>Bact. prod.</i> + <i>Bac. subt.</i>	21	20—22	19	0	keine	fert.		3	100		
	Kontrolle ohne Futter .	12	6—18	8	—	keine	keine					
6	<i>Escherichia coli</i>	12	10—15	5	2	keine	Anl. 2					
	<i>Bacterium ferrugineum</i>	10	8—12	4	2	Anl. 1	fert.		2	100		
	<i>E. coli</i> + <i>Bact. ferrug.</i>	11	10—13	5	2	keine	fert.		1—2	100		
	Kontrolle ohne Futter .											
7	<i>Bacterium ferrugineum</i>	10	8—12	4	2	Anl. 1	fert.		2	100		
	<i>Proactinomyces citreus</i>											
	<i>Bact. ferrug.</i> + <i>Proact. citr.</i>	11	8—12	5	1	keine	fert.		1—2	100		
	Kontrolle ohne Futter .											
8	<i>Bacillus mesentericus</i> II	10	7—14	4	0	keine	keine					
	Braune <i>Sarcina</i>	17	12—22	6	1	keine	fert.		1	80		
	<i>Bac. mesent.</i> + <i>Br. Sarc.</i>	12	10—13	3	1	keine	keine					
	Kontrolle ohne Futter .	6	5—7	3	—	keine	keine					
9	<i>Bacillus mesentericus</i> II	10	7—14	4	0	keine	keine					
	<i>Proactinomyces citreus</i>											
	<i>Bac. mesent.</i> + <i>Proact. citr.</i>											
	Kontrolle ohne Futter .	10	9—11	4	—	keine	keine					

Tabelle 12. Fütterung von *Myxococcus virescens* und *Podangium erectum* mit einer Mischung der Futterbakterienstämme A—E auf reinem Agar. Mittelwerte aus 4 Parallelkulturen.

Futterstämme	Vegetative Entwicklung			Lysisstärke	Fruchtifikation						
	Mittel	Amplitude	$r_2 - r_1$		Fruchtkörperentwicklung		Stärke der Sorus- oder Fruchtkörperbildung		Sorusdurchmesser (μ)	Stielhöhe (μ)	Cysten- oder Fruchtkörpergröße (μ)
					1. Revis.	2. Revis.	1. Revis.	2. Revis.			
A	10	7—14	3	1	keine	fert.		1—2			100
B	15	13—17	6	2	Anl. 2	fert.		3—4			100
C	14	12—16	3	2	Anl. 2	fert.		2—3			150
D	16	15—18	4	1	Anl. 2	fert.		3			150
E	16	12—18	6	2	Anl. 2	fert.		2—3			400×80
A + B + C + D + E	15	13—17	6	1—2	Anl. 2	fert.		4			150
Kontrolle ohne Futter .	2	2—2	2	—	keine	keine					
A	18	16—20	8	1	keine	Anl. 2					
B	25	20—30	14	1	keine	fert.		4	350		100×80
C	10	5—15	8	1	keine	fert.		2	200		80×50
D	5	5—5	5	0	keine	Anl. 1					
E	12	9—15	12	1	keine	Anl. 1					
A + B + C + D + E	11	10—13	8	1	keine	Anl. 2					
Kontrolle ohne Futter .	0	0	—	—	keine	keine					

Fruchtifikation noch stärker gefördert (Zahl der Fruchtkörper weit über 100, gegenüber 10—100 bei der Einzelverfütterung der Stämme); ihre Färbung und Form waren normal. Bei *Podangium erectum* beeinflussten nur die Stämme B und C beide Entwicklungsphasen günstig (Fruchtkörper zylindrisch oder keulig, braun gefärbt), die übrigen förderten nur das vegetative Wachstum. Die Wirkung der Kombination aller Stämme miteinander war schlechter als die der meisten einzelnen Komponenten, sie führte bei geringer vegetativer Entwicklung nur zu Fruchtkörperanlagen, obwohl die Begleitbakterien in den Rohkulturen von *Podangium erectum* stets reichliche Fruchtifikation hervorgerufen hatten. Das liegt wohl sicher zum Teil daran, daß in den Rohkulturen die Begleitbakterien zusammen mit einem organischen

Nährboden wirkten, was bei *Podangium* nach den vorhergehenden Versuchen besonders große Bedeutung hat.

In großen Zügen ergibt sich aus den gesamten Versuchen mit lebendem Futter folgendes: Außer zahlreichen Bakterien ermöglichen auch einige Hefen, Algen und sogar eine *Phlyctochytrium*-Art den untersuchten Myxobakterien-Arten die Entwicklung. Neben den gut verwertbaren gibt es auch schlecht ausnutzbare und unbrauchbare Futterorganismen. *Podangium erectum* als Vertreter der *Polyangiaceen* verhielt sich dabei grundsätzlich nicht anders als die *Myxococcus*-Arten. Die Kultur auf organischen Nährböden mit Futterbakterien führte bei *Podangium erectum* zu einer weit üppigeren Entwicklung als mit Futterorganismen auf nährstofffreiem Substrat. Bei Fütterung mit mehreren Futterorganismen traten auch einige Effekte auf, die nach den Ergebnissen bei den einzelnen Komponenten nicht zu erwarten waren.

B. Besprechung der Ergebnisse.

Betrachtet man nochmals die in der Einleitung angegebene Spanne ausnutzbarer Nahrungsquellen, die sich aus den verschiedenen Literaturangaben für die Myxobakterien zusammenstellen läßt, und vergleicht damit die vorstehenden Ergebnisse, so muß man diese Spanne wenigstens für die vorstehend untersuchten Myxobakterien einschränken, da mineralischer Stickstoff im Gegensatz zu gewissen Literaturangaben gar nicht verwertbar war und nur höhermolekulare N-Verbindungen günstige Wirkung auf die vegetative Entwicklung und Fruktifikation ergaben. Das beste Gedeihen wurde erst bei der Ernährung mit dem Eiweiß lebender Organismen beobachtet. Man darf in diesem Zusammenhang wohl annehmen, daß am natürlichen Standort, dem Erdboden, die antibiotischen und lytischen Fähigkeiten der Myxobakterien eine entscheidende Rolle bei ihrer Ernährung spielen. Aus den obigen Versuchen ergibt sich auch, daß dabei wohl auch in der Natur nicht nur Bakterien, sondern auch Hefen und terrestrische Algen, vielleicht sogar noch weitere Organismengruppen (der Versuch mit *Phlyctochytrium* fiel ja positiv aus!) angegriffen werden, so daß der Bezeichnung „Mikroräuber“ wohl eine noch umfassendere Bedeutung zukommt, als SINGH annehmen konnte.

Daß die Beziehungen zu anderen Organismen aber nicht immer zu einer Tötung und Lysis zu führen brauchen, kann man leicht an der Wirkung von Myxobakterienschwärmen auf Schimmelpilze feststellen, wie sie sich auch bei den vorstehenden Versuchen gelegentlich bei Luftinfektionen in den Kulturen beobachten ließ und wobei sich die Ergebnisse von FINCK (1951) bestätigten. Dabei tritt nämlich häufig eine Hemmung des Pilzwachstums, besonders des Luftmycels, aber keine Abtötung ein. Die Hemmungszone kann hierbei über den Schwarmbereich hinausgehen, während die Tötung von Bakterien und Hefen immer nur in engem Kontakt von Räuber und Beutezellen erfolgt. Bei der Hemmung des Pilzwachstums durch die

Myxobakterien handelt es sich daher sehr wahrscheinlich (wenigstens zum Teil) um eine ganz andere Erscheinung als bei der Wirkung auf Futterorganismen.

Es ist sicher eine interessante Aufgabe, die Wirkung der Myxobakterien auf weitere Bodenorganismen wie Cyanophyceen, Myxomyceten und Pilze zu untersuchen.

Eine noch ganz ungeklärte Frage ist, wie weit die Myxobakterien selbst durch andere Organismen geschädigt werden können, da ja doch antagonistische Beziehungen in der Natur sehr häufig sind (WALLHÄUSSER 1951, OPFERMANN 1951). Aus den vorliegenden Versuchen kann man nur einen Hinweis in dieser Richtung entnehmen: Bei der Prüfung von *Myxococcus virescens* mit einem aus *Escherichia coli* und *Bacterium prodigiosum* kombinierten Futter unterblieb jede Entwicklung des Myxobakteriums, obwohl es bei Gegenwart des einen Futterpartners (*Escherichia coli*) zu gedeihen vermochte. Offenbar wurde die Ausnutzung des *Coli*-Futters durch das anwesende *Bacterium prodigiosum* gehemmt. Überhaupt deutet schon die Tatsache, daß bei Zusammenimpfungen mit einem nicht verwertbaren Futter häufig die ausgesäten Myxobakteriensporen unverändert liegen blieben, während das gleiche Impfmateriel auf reinem Agar sich schwach entwickeln konnte, auf schädigende Einflüsse durch die als Futter gebotenen Organismen hin.

Von einem allgemeinen Bild der Ernährungsverhältnisse der Myxobakterien und den damit eng zusammenhängenden Beziehungen zu anderen Organismen sind wir noch weit entfernt. Es handelt sich ja um eine Organismengruppe, die erst allmählich größeres Interesse erregt, obwohl sie durch besonders eigenartige Erscheinungen ausgezeichnet ist. Erst Untersuchungen an vielen Arten werden klären können, wie weit verschieden voneinander die verwertbaren Nahrungsquellen sein können und wie weit innerhalb der Myxobakteriengruppe die Fähigkeit verbreitet ist, sich von andren lebenden Organismen zu ernähren.

C. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Aus Wildmisten und Bodenproben wurde eine Anzahl Myxobakterien isoliert und von ihnen drei *Myxococcaceen* und eine *Polyangiacee* mit dem KOCHSchen Plattenverfahren rein kultiviert, wozu Sporensuspensionen verwendet wurden, die durch Zerreiben der Fruchtkörper mit Quarzmehl erhalten worden waren.

2. Zur Züchtung der Reinkulturen erwiesen sich Agar-Platten, die abgetötete Suspensionen von *Escherichia coli* oder *Staphylococcus aureus* (in physiologischer NaCl-Lösung oder mit 2% igem Kartoffeldekot) enthielten, als besonders günstig.

3. Den von JAHN angeführten morphologischen Unterschieden zwischen *Myxococcaceen* und *Polyangiaceen* konnte als weiteres unterscheidendes Merkmal das Aussehen des vegetativen Schwarmes hinzugefügt werden.

4. Die Farbstoffbildung des Schwarmes und die Farbe und Form der Fruchtkörper war unter den verschiedenen Versuchsbedingungen sehr unterschiedlich. Die Variabilität ließ sich jedoch nicht auf bestimmte Faktoren zurückführen.

5. Die Verwertbarkeit verschiedener N-Quellen in Verbindung mit Glucose bzw. Stärke und 2% igem Agar wurde — im Vergleich mit Kontroll-Kulturen auf reinem Agar (auf dem schon eine gewisse Entwicklung möglich ist) — geprüft. Dabei ergab sich im wesentlichen: Das vegetative Wachstum von *Myxococcus virescens* und *fulvus* wurde durch Glucose schwach, durch Stärke besser gefördert. Anorganischer Stickstoff wurde nicht verwertet, dagegen hatten Asparaginsäure und Pepton positive Wirkung auf das vegetative Wachstum; Harnstoff ergab keine deutliche Förderung. Nur bei *Myxococcus fulvus* wurde auch die Fruktifikation durch Stärke und Asparaginsäure leicht positiv beeinflusst. Optimale Entwicklung trat auf den synthetischen Substraten in keinem Falle ein.

6. Zu Bakterienfutter-Böden, die an sich gute Entwicklung zulassen, wurden zusätzlich verschiedene N- und C-Quellen und Wirkstoffe gegeben. Bei *Myxococcus virescens* und *fulvus* wirkten höhermolekulare C- und N-Quellen (Stärke, Pepton, Casein) fördernd auf die vegetative und die reproduktive Entwicklungsphase. Die Wirkstoffe (Vitamine der B-Gruppe, Ascorbinsäure, Paraaminobenzoessäure) ergaben hingegen niemals eine starke Förderung, mitunter sogar eine Hemmung der Entwicklung.

7. Bei Fütterung der Myxobakterien mit lebenden Mikroorganismen ohne weitere Nährstoffe ergab sich:

a) Bakterien als Futterorganismen: Die Befunde von SINGH (1947) mit *Myxococcus virescens* ließen sich bestätigen; darüber hinaus wurde nachgewiesen, daß auch *Podangium erectum* in der Lage ist, Futterbakterien zu töten und zu lösen. Von 35 Bakterienstämmen konnten 17 als Nahrung von *Podangium erectum* aufgenommen werden, 18 waren nicht verwertbar. Die Nahrungsauswahl beider Myxobakterienarten war ähnlich; es wurden sowohl grampositive wie gramnegative Futterbakterien ausgenutzt. Für beide Myxobakterien waren nichtpigmentierte als Nahrungsquelle besser geeignet als pigmentierte.

b) Hefen als Futterorganismen: Durch Zusammenimpfen von vier Myxobakterienarten mit 10 Hefearten wurde die lytische Wirkung der Myxobakterien auch auf diese Organismengruppe nachgewiesen. Eine Reihe von Hefen gestattete den Myxobakterien gute vegetative Entwicklung wie Fruktifikation.

c) *Phlyctochytrium* als Futterorganismus: Von drei untersuchten Myxobakterien-Arten konnten sich alle mit dem Phycomyceten *Phlyctochytrium* als Futter gut vegetativ entwickeln, zwei von ihnen fruktifizierten auch reichlich. Der Pilz wurde durch die Myxobakterien geschädigt.

d) Algen als Futterorganismen: Eine Fütterung von drei Myxobakterien-Arten mit acht Grünalgenstämmen ergab in einigen Fällen gute vegetative wie reproduktive Entwicklung. Eine Einwirkung der Myxobakterien auf die Algenzellen war zwar zu erkennen, aber nicht bis zur völligen Lysis nachzuweisen.

8. In Annäherung an natürliche Verhältnisse wurden Futterbakterien auf organischen Nährböden geboten. Die Entwicklung von *Myxococcus virescens* wurde dadurch gegenüber der Wirkung von Fütterung auf reinem Agar nicht gefördert. *Podangium erectum* dagegen entwickelte sich unter diesen Bedingungen üppiger.

9. Bei Fütterung mit mehreren Futterbakterien gleichzeitig (auf reinem Agar) lag häufig die Entwicklung der Myxobakterien zwischen den für die einzelnen Komponenten charakteristischen Entwicklungsstärken; z. T. lagen aber auch andere Verhältnisse vor.

Herrn Professor HARDER möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine stete Anteilnahme bei ihrer Durchführung herzlich danken.

Literatur.

- ANSCOMBE, F. J., and B. N. SINGH: Limitation of bacteria by micropredators in soil. *Nature* **161**, 140 (1948). — BADIAN, J.: Zur Cytologie der Myxobakterien. *Acta Soc. Bot. Polon.* **7**, 1 (1930); Eine cytologische Untersuchung über die Myxobakterie *Polyangium fuscum*. *Acta Soc. Bot. Polon.* **10**, 361 (1933). — BAUR, E.: Myxobakterienstudien. *Arch. f. Protistenkunde* **5**, 92 (1905). — BEEBE, J. M.: The morphology and cytology of *Myxococcus xanthus* n. sp. *J. of Bact.* **42**, 193 (1941); Studies on the Myxobacteria, I, II, III. *Iowa State College Journ. Sci.* **15**, 307; 319; **17**, 227 (1941/42, 1943). — FINCK, G.: Biologische und stoffwechselphysiologische Studien an Myxococcaceen. *Arch. f. Mikrobiol.* **15**, 358 (1951). — GEITLER, L.: Über *Polyangium parasiticum* n. sp., eine submerse, parasitische Myxobakteriacee. *Arch. f. Protistenkunde* **50**, 67 (1924). — IMSENECKI, A., and A. KUSINRINA: Bacteriotrophic microorganisms. *Mikrobiologija* **20**, 3 (1951) (zitiert nach *Biolog. Abstr.* **25**, 9). — JAHN, E.: Kryptogamenflora der Mark Brandenburg: V. Pilze I, Myxobacteriales. Leipzig 1915; Beiträge zur botanischen Protistologie: Die Polyangiden. Leipzig 1924; Kulturmethoden und Stoffwechseluntersuchungen bei Myxobakterien (Polyangiden). *ABDERHALDENS Hdbuch XII*, 2 (1936). — KLIENEBERGER-NOBEL, E.: A cytological study of Myxococci. *Journ. Gen. Microbiol.* **1**, 33 (1944); Changes in the nuclear structure of bacteria, particularly in spore formation. *Journ. Hyg. Camb.* **44**, 99 (1945); Chromatinstrukturen der Bakterien und ihre biologische Bedeutung. *Schweiz. Z. Path. Bakt.* **10**, 480 (1947). — KÜHLWEIN, H.: Beiträge zur Biologie und Entwicklungsgeschichte der Myxobakterien. *Arch. f. Mikrobiol.* **14**, 678 (1950); Neuere Untersuchungen über Myxobakterien. *Zentralbl. Bakt.* **1**, 158 (1952); Untersuchungen über *Chondromyces apiculatus* Thaxter (?). *Arch. f. Mikrobiol.* **17**, 403 (1952). — KRZEMIENIEWSKI, H. u. S.: Die Myxobakterien von Polen, I, II, III. *Acta Soc. Bot. Polon.* **4**, 1 (1926); **5**, 1 (1927); **7**, 250 (1930); Über die Verbreitung der Myxobakterien im Boden. *Acta Soc. Bot. Polon.* **5**, 46 (1928); Zur Morphologie der Myxobakterienzelle. *Acta Soc. Bot. Polon.* **5**, 6 (1928); Die zellulosezersetzenden Myxobakterien. Zersetzung der Zellulose durch Myxobakterien. *Bull. Acad. Polon. Sci. Lettr. Classe Sci. Math. Nat. Ser. B, Sci.*

Nat. I. (1937). — MEYER-PIETSCHMANN, K.: Lebendbeobachtungen an *Myxococcus rubescens*. Arch. f. Mikrobiol. **16**, 163 (1951). — MILOVIDOV, P. F.: Ergebnisse der Nuclealfärbung bei den Myxobakterien und einigen anderen Bakterien. Arch. f. Mikrobiol. **6**, 475 (1935). — NORÉN, B.: Myxobacteria in soils. Nature **167**, 225 (1951). — OPPERMAN, A.: Das antibiotische Verhalten einiger holzzeretzender Basidiomyceten zueinander und zu Bakterien. Arch. f. Mikrobiol. **16**, 364 (1951). — OXFORD, A. E., and B. N. SINGH: Factors contributing to the bacteriolytic effect of species of Myxococci upon viable Eubacteria. Nature **158**, 745 (1946). — PIEKARSKI, G.: Zum Problem des Bakterienzellkerns. Erg. Hyg. **26**, 333 (1949). — PINOY, M. E.: Sur la nécessité d'une association bactérienne d'une Myxobakterie (*Chondromyces crocatus*). Ann. Inst. Past. **35**, 487 (1921). — QUEHL, A.: Untersuchungen über die Myxobakterien. Zentralbl. f. Bakt. **2**, 190 (1906). — SINGH, B. N.: Myxobacteria in soils and composts, their distribution, number and lytic action. Journ. of Gen. Microbiol. **1**, 1 (1947). — SNIESZKO, S. F., McALLISTER and HITCHNER: On the biology of certain myxobacteria (an abstract). Journ. of Bact. **41**, 26 (1941); Further studies on the biology of certain myxobacteria (an abstract). Journ. of Bact. **43**, 28 (1942). — SOLNTZEWA, L. J.: On the lysis of phytopathogenic bacteria caused by myxobacteriales. Mikrobiologija (Moskau) **8**, 700 (1939); Biologie der Myxobakterien II: Melittangium und Chondromyces. Mikrobiologija **10**, 505 (1941). — STANIER, R. Y.: A note on elasticotaxis in Myxobacteria. Journ. of Bact. **44**, 405 (1942). — VAHLE, K.: Vergleichende Untersuchungen über die Myxobakterien und Bakterien sowie die Rhodobakterien und Spirillaceen. Zentralbl. f. Bakteriologie **2**, 178 (1909). — WALLHÄUSSER, K. H.: Die antibiotischen Beziehungen einer natürlichen Mikroflora. Untersuchungen über das antagonistische Verhalten von Mikroorganismen am natürlichen Standort. Arch. f. Mikrobiol. **16**, 201, 237 (1951).

(Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung Quedlinburg der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin.)

Über den Entwicklungsgang von *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox.) Stone.

I. Die Bildung der Fortpflanzungsorgane in „normalen“ Kulturen*.

Von

GEORG SÖRGEL.

Mit 12 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. April 1953.)

Die genaue Kenntnis der Biologie eines parasitischen Pilzes ist nicht nur zum Verständnis der durch ihn hervorgerufenen Krankheit unbedingt erforderlich, sondern bei der Aufklärung eines erst unvollkommen bekannten Entwicklungsganges können auch wertvolle Hinweise auf eine erfolgsversprechende Bekämpfung gewonnen werden. Da auch von dem auf Erbsen häufig vorkommenden Ascomyceten *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox.) Stone recht wenig bekannt ist, wurde versucht, unter genau bekannten und kontrollierbaren Bedingungen den Entwicklungsablauf zu klären.

Die bei diesem Pilz in Pyknidien entstehenden Conidien sind allgemein bekannt, bzw. stellen das am meisten ins Auge fallende Fortpflanzungsorgan dar. Pyknidien werden sowohl in der Natur als auch in künstlicher Kultur reichlich gebildet. Die Pseudothecien, in denen die Ascosporen entstehen, wurden in der Natur nur hin und wieder auf Erbsenkraut und verrottendem Stroh beobachtet (JONES 1927, WEHLBURG 1932). Von ihrem Auftreten in Reinkulturen wird nur selten berichtet (JONES 1927). Über die ebenfalls auftretenden Chlamydosporen waren in der Literatur überhaupt keine Angaben zu finden, sofern man nicht die Befunde von LUDWIG (1928) so deuten möchte, daß er nicht *Ascochyta pisi* Lib., sondern *Mycosphaerella pinodes* vor sich gehabt hat. Über die Bedingungen, die zur Ausbildung der einzelnen Organe führen, war bisher nichts bekannt. Deshalb sollte zunächst in künstlicher Kultur Klarheit darüber gewonnen werden, um dann gegebenenfalls Rückschlüsse auf das Verhalten des Pilzes in der Natur ziehen zu können.

Ausgangspunkt aller Kulturen war ein Stamm von *Mycosphaerella pinodes*, der von einem befallenen Samen der Schalerbsensorte „Überreich“ isoliert und in Reinkultur gebracht wurde. Alle hier erwähnten Kulturen gehen auf eine einzige aus einem Ascus isolierte Ascospore zurück. Die Untersuchungen wurden ausnahmslos mit Hilfe der Filtrierpapiermethode¹ ausgeführt (SÖRGEL 1951). Als Papiersorte

* Quedlinburger Beiträge zur Züchtungsforschung Nr. 14.

¹ In einer größeren steht eine kleinere, bis an den Rand mit Nährlösung gefüllte Schale, auf der eine Filtrierpapierscheibe liegt.

wurde das Papier 597 von Schleicher und Schüll benutzt, welches sich für derartige Untersuchungen sehr gut bewährt hat. Die Kulturen standen in einem dunklen Thermostaten bei 24° C. Als günstiges Nährmedium wurde meist ein 1%iger Samenschalendekokt der stark anfälligen Markerbsensorte „Wunder von Kelvedon“ genommen.

Die Reaktion eines Pilzes auf unterschiedliche Bedingungen kann vor allem dadurch geklärt werden, daß man von einem Grundnährboden ausgehend die stoffliche Zusammensetzung stufenweise fortlaufend ein wenig ändert. In vorliegender Arbeit soll deshalb zunächst nur das Verhalten auf einem solchen Grundnährboden untersucht werden. Da in einem Samenschalendekokt einer anfälligen Erbsensorte, wie an anderer Stelle (SÖRGEL 1952) gezeigt werden konnte, alle zu einer ausreichenden, wenn nicht sogar optimalen Ernährung von *Mycosphaerella pinodes* notwendigen Stoffe vorhanden sein dürften, gingen diese Untersuchungen von diesem Medium als Grundnährboden aus.

Eine genaue Erfassung der verschiedenen Fortpflanzungsorgane wurde dadurch ermöglicht, daß das Filtrierpapierblatt vor dem Sterilisieren in eine Anzahl konzentrisch angeordneter Ringe eingeteilt wurde (vgl. Abb. 12). Der Abstand dieser mit Bleistift gezogenen Ringe mußte wegen der Kleinheit der Pseudothecien und besonders der Chlamydosporen bei den meisten Kulturen 1 mm betragen. Acht Radian, die jeden Ring in acht gleich große „Felder“ teilten, erleichterten das Auf- und vor allem das Wiederfinden der Organe wesentlich. Beim Zählen, welches unter einem Binokularmikroskop meist bei 40facher Vergrößerung im allgemeinen bei Unterbeleuchtung vorgenommen wurde, blieben die Schalen meist geschlossen, um Veränderungen der Luftfeuchtigkeit und der Konzentration der Nährlösung durch Verdunsten zu verhindern. Allerdings mußte der Schalendeckel durch einen vollkommen planen Deckel einer anderen leeren sterilen Schale ersetzt werden, da anhaftendes Kondenswasser und nicht ebenes Glas ein einwandfreies Auffinden und Erkennen aller Organe in Frage stellen konnten.

Greifen wir von den zahlreichen auf einem 1%igen Samenschalendekokt angesetzten Kulturen zunächst eine Serie von 10 Kulturen heraus, die am gleichen Tage so gestaffelt beimpft worden waren, daß bei dem gleichbleibenden Zeitabstand für das Zählen die Kulturen zu den einzelnen Beobachtungszeiten gleiches Alter hatten, so daß die erhaltenen Zahlen leicht miteinander verglichen werden konnten. Übereinstimmend waren in allen 10 Kulturen, die anfangs dreistündlich beobachtet wurden, nach 45 Stunden im ersten Imm-Ring¹ die ersten Anlagen von Fruchtkörpern vorhanden. Im Durchschnitt waren es 5,7 Felder, in denen die Bildung begonnen hatte. Dabei war in 45,6% dieser besiedelten Felder des ersten Ringes aller 10 Kulturen je ein Organ je Feld vorhanden; zwei Organe waren es in 36,8%, drei in 8,8%, vier in 7,0% und fünf in 1,8% der Felder. Diese bei der angewandten Vergrößerung kreis- oder fast kreisförmigen, noch nicht kugeligen, sondern mehr uhrglasförmig gewölbten Gebilde hoben sich von dem wenig hervortretenden Mycel als

¹ Die sich im inneren 2 mm-Kreis schon noch früher bildenden Fortpflanzungsorgane wurden in keinem Falle mit in die Betrachtung einbezogen.

kompakte, schwach gelblich gefärbte Stellen aus der Umgebung heraus. Es war jedoch in diesem Entwicklungszustand nur sehr schwer oder in den meisten Fällen überhaupt nicht möglich, zu entscheiden, um welche Organe es sich dabei handelte.

Drei Stunden später hatte die Entwicklung auf 6,9 Felder übergreifen. Zwar war noch in 26,5% der Felder je ein Organ vorhanden, doch waren schon in 2,9% sieben Organe zu finden. Die Zahl der Fruchtkörperanlagen hatte sich während dieser 3 Std etwa verdoppelt (von 10,3 je Kultur war ihre Zahl auf 19,8 angestiegen). Viele der zuerst entstandenen Organe waren jetzt deutlich als Kugeln zu erkennen. Nach weiteren sechs Stunden waren in allen acht Feldern des ersten Ringes bereits Organe ausgebildet. Auch im zweiten Ring hatte die Bildung ihren Anfang genommen: in 4,7 Feldern waren einzelne Organe zu finden.

Als 18 Stunden später (72 Std nach dem Beimpfen) die Kulturen wieder beobachtet wurden, hatte eine erhebliche Veränderung stattgefunden. Nicht nur, daß die Zahl der Organe sich beträchtlich vermehrt hatte — war doch ihre Zahl auf 165,8 je Kultur angestiegen und ihre Entstehung bis zum vierten Ring vorgedrungen —, sondern vor allem konnte bei gleichzeitiger Größenzunahme die Mehrzahl von ihnen besonders im ersten, aber auch schon im zweiten Ring als Pyknidien identifiziert werden.

Die älteren unter ihnen waren als Ganzes stärker gefärbt, wiesen aber am Scheitel einen hell erscheinenden Kreis auf, der von einem Ring aus deutlich dunkler gefärbten Zellen umgeben war. Dieser Ring umschließt einen Porus. Gelegentlich werden an einer Pyknidie auch zwei oder drei Öffnungen gebildet. Die Ringfarbe war zu diesem Zeitpunkt noch ganz unterschiedlich. Alle Übergangsstufen, von kräftigem Dunkelbraun bei den zuerst gebildeten Pyknidien bis zu schwachem, zum Teil gerade erst angedeutetem Hellbraun bei vielen später entstandenen, waren in den Kulturen zu finden. Dieses Merkmal unterscheidet bei typischer Ausbildung die Pyknidien eindeutig von den Pseudothecien.

Im ersten Ring waren im Durchschnitt 38,9%, im zweiten 26,0% und im dritten 3,6% der Fortpflanzungsorgane als Pyknidien zu erkennen.

Bei einem Teil dieser Pyknidien war besonders im ersten Ring auf der eben erwähnten Öffnung ein glänzender Tropfen zu bemerken. Durch die klare Flüssigkeit hindurch sind die Pyknidien aber noch deutlich zu erkennen. Werden sie älter, so vergrößert sich dieser Tropfen immer mehr; da Pyknidien verschiedener Altersklassen nebeneinander liegen, sind dementsprechend die Tropfen verschieden groß. Falls der Tropfen nicht herabläuft, wird er bei ungestörter Entwicklung meist sogar größer als die Pyknidie selbst. Diese offenbar aktiv ausgepreßte Flüssigkeit enthält Stoffe, die ihr auch die zähe klebrige Beschaffenheit verleihen. Daß Stoffe in ihm vorhanden sein müssen, geht auch daraus hervor, daß beim Eintrocknen, was man leicht durch Abnehmen des Schalendeckels und Offenstehenlassen der Kultur erreichen kann, eine zarte weißliche Kruste

zurückbleibt. Erst dann, wenn ein Tropfen ausgeschieden ist, treten auch die Conidien aus. Sie erscheinen zunächst einzeln deutlich erkennbar in der Flüssigkeit. Ihre Zahl nimmt immer mehr zu, bis sie schließlich in einem zusammenhängenden Strang hervortreten, der in der Flüssigkeit vielfach gewunden erscheint. Die Zahl der Conidien wird bald so groß, daß der ganze Tropfen ausgefüllt wird. Dabei färbt sich dieser immer intensiver, bis er schließlich als undurchsichtige Masse in Gestalt einer rötlich gefärbten Kugel der Pyknidie aufsitzt, die ganz und gar darunter verschwindet. Während der Reife reißt die Öffnung der Pyknidie häufig, entweder unregelmäßig oder in vielen Fällen gleichmäßig nach zwei entgegengesetzten Richtungen auf. Der dabei entstehende Spalt vergrößert sich ganz allmählich. Dabei wird natürlich die umgebende braune Zellschicht gesprengt. Wird, wie es hin und wieder vorkommt, kein Tropfen ausgeschieden, so treten die Conidien auch ohne viel Flüssigkeit aus. Dabei entsteht die auch bei vielen anderen Pilzen mit Pyknidien bekannte Schleimranke. Doch kommt diese wahrscheinlich oft — jedenfalls deuten die Befunde bei unserem Pilz darauf hin — so zustande, daß zwar anfänglich ein Tropfen gebildet werden mag, der aber bei niedrigerer Luftfeuchtigkeit, als sie z. B. in den Kulturschalen herrscht, verdunstet, wobei nur die Conidienranke übrigbleibt. So mögen die bei vielen Pilzen oft allein beschriebenen Schleimranken zum Teil wohl nur eine Folge niedriger Luftfeuchtigkeit sein.

Nach 78 Stunden waren im fünften Ring die ersten Organe vorhanden, im dritten Ring die ersten Tropfen gebildet und im ersten einzelne Pyknidien reif geworden (wobei der Beginn der Reife mit dem Erscheinen der ersten Conidien gleichgesetzt wird). Neue Organe waren in den ersten beiden Ringen nur noch wenig mehr gebildet worden. Allerdings hatte eine weitere Differenzierung stattgefunden: wesentlich mehr Organe waren eindeutig als Pyknidien erkennbar. Auffälligerweise waren mehrere Anlagen nicht so stark herangewachsen, auch war bei ihnen weder ein Ring noch eine Öffnung zu erkennen. Es machte den Eindruck, als ob sie auf einer frühen Entwicklungsstufe stehen bleiben würden. Mehr ließ sich vorerst nicht über sie aussagen. Immerhin waren es in den beiden inneren Ringen zusammen etwas weniger als ein Viertel der Gesamtorgane (20,4%), die in diesem Zustand verblieben waren.

In den nächsten Stunden ging die Organbildung in der eben beschriebenen Art und Weise weiter (das Beobachtungsintervall betrug von nun an 24 Std). Sie erfaßte in den nächsten Tagen weitere Teile der Kulturoberfläche. Dabei rückte die Zone, in der die Pyknidien deutlich als solche erkennbar waren, immer mehr vor; ihr folgte, allerdings nicht scharf abgegrenzt, eine Zone, in der die Pyknidien vorwiegend Tropfen trugen. Schließlich waren am weitesten nach innen die meisten von ihnen reif geworden. Wie aus Abb. 1 hervorgeht, in der das Erscheinen der Tropfen

und das allmähliche Reifen bei unseren Kulturen (Mittelkurve aus 10 einander sehr ähnlichen Einzelkurven) dargestellt ist, waren die meisten Tropfen bei 96 und 120 Stunden vorhanden. Diese Tropfen wandelten sich erst langsam, dann immer schneller werdend in die hellrosa gefärbten Kugeln um. Das Aussehen der Kulturen unterschied sich daher ganz auffällig bis zu 144 Std von dem nach 168 Std. Waren es zuerst die großen hellen Tropfen, so waren es später die rötlich gefärbten Kugeln, die den Kulturen ihr charakteristisches Aussehen verliehen. Allerdings wurden nicht immer sämtliche Pyknidien einer Kultur reif. Bei unseren Kulturen kamen im Mittel 87,9% Pyknidien zur Reife. Da die Tropfenbildung im allgemeinen dem eigentlichen Reifen vorangeht und vielleicht ein Stadium darstellt, welches wenigstens unter bestimmten Außenbedingungen durchlaufen werden muß, sei die Tropfenbildung hier als Vorreife bezeichnet.

War die Bildung der Fortpflanzungsorgane bisher immer mehr angestiegen und zwischen 96 und 120 Std, als die ersten Organe im neunten Ring erschienen, ein Optimum in der Entwicklungsgeschwindigkeit erreicht, so verzögerte sich das Auftreten neuer Organe von nun an merklich. Während des Optimums wurden 7,3 Organe in der Stunde gebildet, zwischen 120 und 144 Std während des gleichen Zeitraumes reichlich halb so viel. Drei Tage lang verlief die Organbildung mit etwa der gleichen Intensität. Es hatte bei dieser schleppenden Weiterentwicklung fast den Anschein, als würde sie vollständig zum Erliegen kommen. Doch, als sich die ersten Organe in einem Abstand von 16 mm vom Mittelpunkt aus gerechnet bildeten, trat in allen Kulturen fast gleichzeitig eine überraschende Veränderung ein. Die Organbildung setzte erneut so lebhaft ein, daß je Stunde optimal 29,1 Organe dazukamen, d. h. gegenüber dem vorhergehenden Optimum wurden fast viermal soviel in der Stunde gebildet.

Wie Abb. 2 zeigt, kam diese Neubildung aber fast ebenso schnell wieder zum Erliegen. Dabei betraf sie nicht nur die äußeren Ringe, in denen bisher keine oder nur wenige Organe vorhanden waren, sondern auch die inneren bereits besiedelten Ringe. Im Gegensatz zum bisherigen

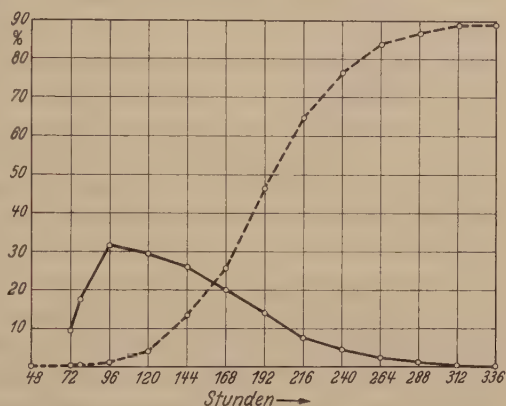


Abb. 1. Vorreife und Reife bei den Pyknidien. Mittelkurve aus 10 Einzelkurven. ○—○ Tropfenausscheidung; ○—○ Reife der Pyknidien.

Verhalten blieben von nun an die meisten Organe klein; nur wenige entwickelten sich zu Pyknidien. Sie hatten auch eine etwas andere Form: sie waren weniger kugelig als diese und außerdem im erwachsenen Zustande länger als breit. Eine Öffnung bildete sich bei ihnen ebenfalls aus, doch war sie breiter und flacher als bei den Pyknidien. Nicht alle diese Organe entstanden einzeln, sondern ab und zu waren zwei bis sieben dicht nebeneinander auf einer gemeinsamen Unterlage ausgebildet, die

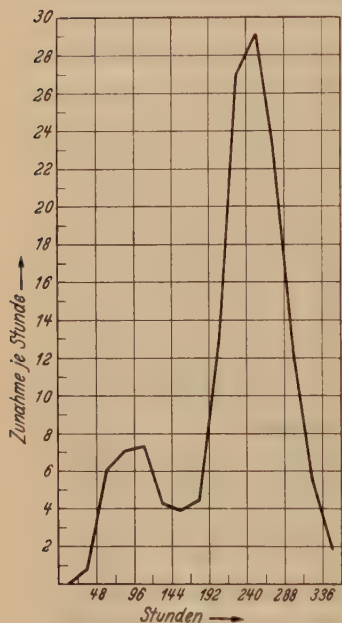


Abb. 2. Mittlere stündliche Zunahme der Fortpflanzungsorgane [Pyknidien (linker Gipfel) und Pseudothecien (rechter Gipfel)] in 10 Kulturen.

anfangs einer Pyknidienanlage ähnlich sah, bzw. sich zu einem einzigen Organ hätte entwickeln können. Daran bildeten sich dann — im allgemeinen nicht zur gleichen Zeit — mehrere Einzelorgane mit je einer Öffnung aus. Wie eine mikroskopische Prüfung ergab, befanden sich in diesen Organen nach einiger Zeit Asci mit Ascosporen. Diese als Pseudothecien zu bezeichnenden Organe können sich also auch bei unserem Pilz wie bei gewissen anderen verwandten Ascomycetenordnungen bzw. -familien auf einem Stroma entwickeln, mit dem Unterschied allerdings, daß die Stromata in unserem Falle als Ausnahmen zu gelten haben. Auch aus den Pseudothecien treten vor der eigentlichen Reife Tropfen hervor, doch fallen diese wegen ihrer Kleinheit weit weniger auf. Die Farbe der mit Ascosporen angefüllten Kugel ist wesentlich blasser als bei den Pyknidien.

Die „zurückgebliebenen“ Organe in den ersten Ringen, von denen schon die Rede war, stellen auch nichts anderes als Pseudothecien dar. Allerdings unterscheiden sich

diese insofern von den später gebildeten dadurch, daß nur selten eines von ihnen zur vollen Reife gelangt. Sie stellen vorzeitig ihr Wachstum ein, so daß mit Recht wenigstens teilweise von einem Zurückbleiben gesprochen werden kann.

Überraschenderweise entstanden die im Innern der Kulturen sich neubildenden Organe nicht unmittelbar auf dem Filtrierpapier, sondern ausschließlich auf den schon vorhandenen Pyknidien. Dabei war es gleichgültig, ob diese bereits das Stadium der Vorreife oder Reife erreicht hatten oder nicht. An verschiedenen Stellen, meist jedoch nicht in unmittelbarer Nähe des Scheitels, tauchen diese Organe zunächst als kleine kugelige, dann sich in die Länge streckende Körper auf. Auch in ihnen

entstandenen Asci, die sich in nichts von denen unterschieden, die in den weiter außen befindlichen Pseudothecien gebildet wurden. Abb. 3 zeigt

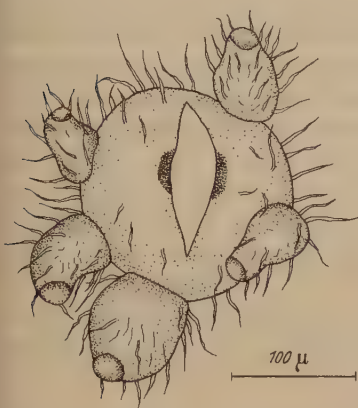


Abb. 3. Reife Pyknidie mit fünf Pseudothecien (der Tropfen mit den Conidien wurde vor dem Zeichnen entfernt).

eine solche mit fünf Pseudothecien besetzte Pyknidie. Allerdings waren nicht alle auf den Pyknidien entstehenden Organe Pseudothecien; ein verschwindend geringer Prozentsatz ließ sich schon an der Form als Pyknidien erkennen. Nicht in allen Fällen war eine eindeutige Unterscheidung dieser beiden Organe leicht, besonders dann, wenn die Pyknidien klein waren. Erschwerend kommt hinzu, daß gelegentlich Zwischenformen entstehen, die entweder ganz steril sind oder aber äußerlich den Pseudothecien ähneln, jedoch Conidien enthalten.

Wie aus Abb. 4 hervorgeht, kommt die Pseudothecienbildung erst dann in

Gang, wenn die Ausbildung der Pyknidien nahezu abgeschlossen ist. Ganz vereinzelt findet man auch in den äußeren Ringen einige Pyknidien. Die Hauptmasse der Organe wird, abgesehen von den noch zu besprechenden Chlamydosporen, außerhalb einer Entfernung von

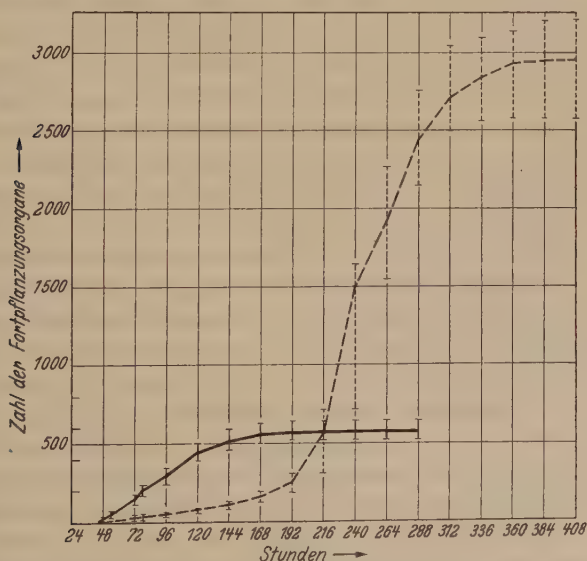


Abb. 4. Verlauf der Pyknidien- (—) und Pseudothecienbildung (---) bei 10 Kulturen (Mittelkurve; die extremen Schwankungen sind durch die senkrechten Striche angedeutet).

16 mm vom Mittelpunkt der Kultur von den Pseudothecien gebildet. Nach etwa 408 Std Kulturdauer ist auch die Pseudothecienbildung zum Stillstand gekommen.

Unsere bisherigen Feststellungen ergeben also, daß die Ausbildung der Fortpflanzungsorgane in getrennten Phasen vor sich geht. In der ersten Phase entstehen Pyknidien, in der zweiten Pseudothecien. Das bedeutet jedoch keineswegs, daß in der ersten Phase überhaupt keine Pseudothecien, in der zweiten gar keine Pyknidien entstehen könnten. Es war ja schon die Rede davon, daß in den ersten Ringen einige Pseudothecien zu finden waren. Berechnet man, wie groß die Zahl dieser Pseudothecien ist, so ergibt sich, wie Tab. 1 zeigt, daß während des Anstiegs

Tabelle 1. Prozentsätze der während der Pyknidienphase entstehenden Pseudothecien.

Stunden	48	54	72	78	96	120	144	168	216
Pseudo- thecien	0,00	10,49	13,47	13,71	13,66	14,28	16,67	20,74	27,59

der Pyknidienbildung bis 120 Std rund 13% aller gebildeten Organe Pseudothecien sind. Wie sich jedoch weiterhin zeigte, sind auch in den inneren Ringen die zuerst entstehenden Organe immer Pyknidien; erst nachdem ein Ring vollständig oder fast vollständig besiedelt worden ist, können einzelne Pseudothecien zur Entwicklung gelangen. Es behält also das Nacheinanderentstehen der Organe selbst während der Pyknidienphase seine Gültigkeit. Wir können außerdem sagen, daß *Mycosphaerella pinodes* sich dadurch auszeichnet, daß unter den angewandten Kulturbedingungen 13% der während der Pyknidienphase gebildeten Organe Pseudothecien sind. (Einschränkend sei bemerkt, daß diese Feststellung vorerst nur für die von uns verwendete Herkunft zutrifft.)

Bei den Zählungen in einem 24 Std-Intervall hatte sich ergeben, daß sich bis zu diesem Entwicklungszustand der Kulturen zwei deutlich begrenzte Zeitabschnitte heraushoben, in der der Pilz offenbar eine besondere Aktivität entfaltet. An weiteren Kulturen, die in einem 6 Std-Rhythmus gezählt wurden, sollte festgestellt werden, ob zwischen diesen beiden besonderen Punkten Unterschiede zu verzeichnen sind. Für die Pyknidienphase sei das Ergebnis einer einzigen Kultur wiedergegeben. In Abb. 5 ist die Pyknidienentwicklung für jeden Ring getrennt wiedergegeben (das Papier war in diesem Falle mit 2 mm-Ringen versehen worden). Dabei zeigt sich erstens, daß in der Entwicklungsintensität zwischen den ersten fünf Ringen keine großen Unterschiede bestehen; erst vom sechsten Ring an nimmt die Bildung schnell ab. Zweitens verläuft für jeden Ring die Bildung in einer Optimumkurve, wobei sich der dritte Ring etwas hervorhebt. Dieses Optimum, in das der Pilz nach

96 Std eingetreten ist, fällt aber zeitlich genau mit dem Optimum aus Abb. 2 zusammen.

Für das zweite Optimum war von 168 Std an mit einer Zunahme der Pseudothecien zu rechnen. Um auch den Anfang der Phase mit zu erfassen, wurde eine Serie von 10 Kulturen angesetzt, die bis zu 138 Std Kulturdauer unberührt im Thermostaten stehen blieben. Von diesem Zeitpunkt an wurde bis zu 234 Std regelmäßig in einem 6 Std-Rhythmus

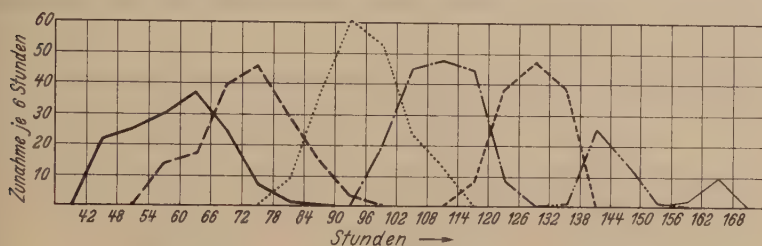


Abb. 5. 6stündige Pyknidienzunahme in den ersten sieben 2 mm-Ringen einer Kultur.

— Ring 1; — Ring 2; Ring 3; — Ring 4; - - - Ring 5; - - - Ring 6; — Ring 7.

gezählt. Von 150 Std an steigt die Pseudothecienbildung ganz allmählich an (Abb. 6), bis eine Neubildung von 25 Organen in 6 Std erreicht wird. Von da ab geht die Bildung aber außerordentlich schnell vonstatten. Sie fängt auch fast unvermittelt an. Optimal wird die Entwicklung zwischen 210 und 216 Std. Der optimale Wert von 97,1 Organen entspricht umgerechnet gut dem bei der 24stündigen Zählung erhaltenen.

Danach wird die Menge der neu hinzukommenden Organe wieder geringer, um später noch einmal etwas anzusteigen. Von den 10 Kulturen wichen zwei insofern etwas ab, als bei ihnen das Optimum schon 6 Std früher erreicht wurde. Eine geringe Abweichung kann also zwischen einzelnen Kulturen bestehen. Das ändert aber am allgemeinen Bild nichts. Ein

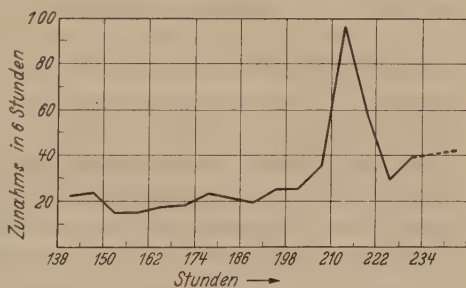


Abb. 6. Verlauf der Pseudothecienbildung (Mittelwert aus 10 Kulturen).

Vergleich mit anderen hier nicht erwähnten Kulturen zeigt im übrigen, daß solche Abweichungen sehr selten sind.

Etwas erstaunlich erscheint jedoch die Tatsache, daß das Pseudothecienoptimum, welches wir eben erhalten haben, nicht mit dem zweiten Optimum aus Abb. 2 zusammenfällt. Doch waren bei jener Darstellung auch die wenigen noch neu entstehenden Pyknidien und die sich auf den Pyknidien entwickelnden Pseudothecien mitgerechnet worden. Ein

direkter Vergleich ist in diesem Falle nicht möglich, da diese Pseudothecien nicht bei jeder Zählung mit erfaßt wurden. Aus den vorhandenen Zahlen konnte jedoch schon entnommen werden, daß das Optimum für diese Organe später lag. Über ihre Zunahme in einer anderen Kulturserie gibt Tab. 2 Aufschluß. Zwar wurden diese Kulturen in einem 24 Std.-Rhythmus gezählt, doch sind die erhaltenen Werte schon aufschlußreich genug. Die Vermutung, daß diese Pseudothecien nicht nur später entstehen, sondern daß auch ihr Optimum später liegt, ließ sich eindeutig bestätigen.

Tabelle 2. *Zunahme der sich auf den Pyknidien bildenden Pseudothecien (Mittelwert aus 10 Kulturen).*

Stunden	Zunahme	Stunden	Zunahme
144—168	0,00	240—264	44,22
168—192	2,16	264—288	30,62
192—216	15,96	288—312	24,12
216—240	33,05		

Zusammenfassend läßt sich daher sagen, daß zwischen der Pyknidien- und der Pseudothecienphase wesentliche Unterschiede bestehen. Erstreckt sich die Bildung der Pyknidien, was ihre Intensität anbetrifft, über einen längeren Zeitraum ziemlich gleichmäßig, so ist die Bildung der Pseudothecien auf einen engeren Zeitabschnitt zusammengedrängt. Dabei ist das Optimum der Bildung für die äußeren Pseudothecien etwas verschieden von dem für die „Pyknidienpseudothecien“.

Unser Bild über den Verlauf der Ausbildung von Fortpflanzungsorganen wird durch das Auftreten des dritten vorkommenden Organs, der Chlamydospore, noch verwickelter. Diese rein vegetativen Organe entstehen durch Ausbildung zahlreicher, dicht liegender Querwände in den Hyphen. Sie liegen teils einzeln, teils zu zweien oder mehreren hintereinander. Oft kommen aber auch längere Ketten vor. Nicht selten tritt durch weitere Wandbildung eine nochmalige Aufteilung ein, wodurch entweder regelmäßige oder etwas unregelmäßige Reihen und Haufen zustande kommen. Abb. 7 soll ein Bild von den Chlamydosporen vermitteln, wie sie in vorliegendem Falle in einem einzigen Feld eines Ringes auftreten können. Zu Anfang ihrer Entstehung sind sie so hell, daß sie sich nur sehr wenig vom Papier abheben. Schnell nehmen sie jedoch eine hellbraune, etwas langsamer eine dunkelbraune Farbe an. Deshalb sehen alte Kulturen makroskopisch schwarz aus. Diese Organe sind auch wesentlich kleiner als Pseudothecien oder Pyknidien. Daher stößt ihre exakte Erfassung auf gewisse Schwierigkeiten. Wenn sie in einer Anzahl von Kulturen trotzdem gezählt wurden, so muß man sich darüber klar sein, daß die erhaltenen Zahlen nur Mindestwerte darstellen können.

Bei den auf Seite 248 besprochenen Kulturen wurde der Verlauf der Chlamydosporenbildung so erfaßt, daß nur die Zahl der Felder, in denen sie vorhanden waren, bestimmt wurde. Wie Abb. 8 zeigt, begann ihre Bildung nach 192 Std, also noch während der Pseudothecienphase. Nicht in allen Feldern konnten zu diesem Zeitpunkt Chlamydosporen gefunden werden: im Mittel waren es nur 0,7 Felder je Kultur. Doch ging die weitere Ausbreitung sehr schnell vor sich. Nach 216 Std waren es 41,8, nach 240 Std bereits 88,5 und nach nochmals 24 Std 144,9 Felder, in denen sie aufgetreten waren. Als nach 408 Std Kulturdauer die Beobachtung dieser Kulturen abgebrochen wurde, waren in 192 Feldern

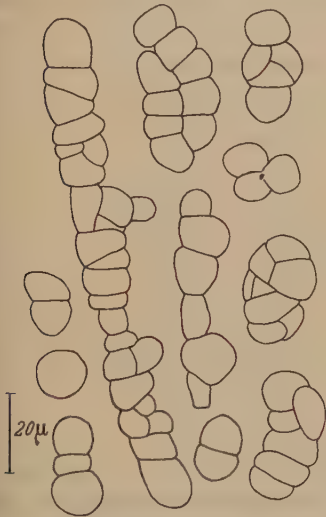


Abb. 7. Chlamydosporen verschiedenster Anordnung aus einem Feld einer Kultur.

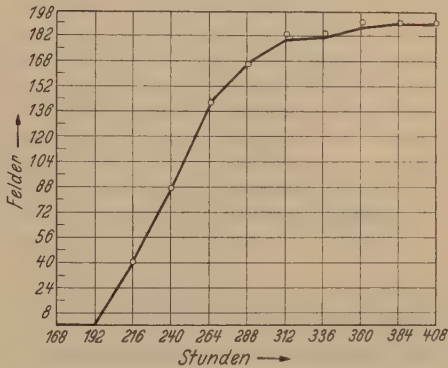


Abb. 8. Verlauf des Auftretens der Chlamydosporen in einzelnen Feldern einer Kultur.

Chlamydosporen vorhanden. Würde das Vorrücken gleichmäßig in geschlossener Front vor sich gehen, so müßte zu den angegebenen Beobachtungszeiten die Zahl der Felder besiedelt sein, die durch Kreise in der Abbildung angegeben ist. Wie klar ersichtlich, sind die Abweichungen von den experimentell gefundenen und auf der Kurve liegenden Werten nur unbedeutend. Das bedeutet also, daß sich in den Hyphen gleichmäßig kreisförmig vorrückend die Chlamydosporen ausbilden. Es wurden also nach jeweils 24 Std zunächst fünf, dann sechs und sieben Ringe erfaßt. In den folgenden Tagen geschieht das Vorrücken wieder langsamer, es kommen noch drei, dann zwei und schließlich nur noch ein Ring dazu.

Die Ausbreitung geht also zur gleichen Zeit wie die Bildung der Pseudothecien im Innern der Kultur vor sich. Es wäre nun aber ein Irrtum, anzunehmen, daß auch die mengenmäßige Zunahme während dieser Zeit erfolgt. In Abb. 9 ist der Verlauf der Chlamydosporenzunahme aus einer

Kultur wiedergegeben, bei der von 48 bis 360 Std alle Organe in einem 6 Std-Rhythmus gezählt wurden. Der Beginn lag auch hier in Übereinstimmung mit den anderen Kulturen bei 192 Std. Die Zahl der Sporen wuchs rasch an und erreichte bald ein Optimum. Doch war dieser Anstieg nur vorübergehend. Lange Zeit hindurch war eine fast konstante Zunahme um 160 je 6 Std zu verzeichnen. Dann aber setzte eine sprunghafte Beschleunigung der Vermehrung ein und erreichte mit 1969 Chlamydosporen in 6 Std den Höchstwert aller Organe. Danach fiel die Bildung wieder ziemlich schnell ab. Allerdings war nach 408 Std, als die Kultur noch alle 24 Std beobachtet wurde, ihre Vermehrung noch nicht vollkommen zum Stillstand gekommen. Die Bildung

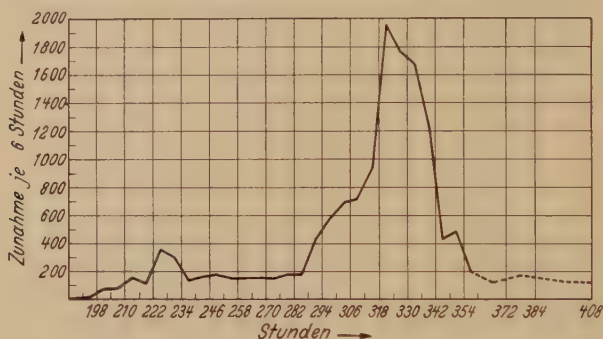


Abb. 9. Verlauf der Chlamydosporenzunahme je 6 Std.

der Chlamydosporen unterscheidet sich demnach vom Auftreten der anderen Organe insofern, als sich hier eine früher liegende Ausbreitungsphase von einer nachfolgenden Vermehrungsphase unterscheiden läßt.

Wir sehen also, daß, wie gegen Ende der Pyknidienphase die eigentliche Pseudothecienphase anfängt, gegen Ende der Pseudothecienphase die Chlamydosporenphase einsetzt, die durch eine intensive Neubildung zu den schon vorhandenen ganz wenigen Chlamydosporen ausgezeichnet ist. Unsere Untersuchungen ergeben demnach, daß die zweite Entwicklungsphase von der dritten, der Chlamydosporenphase, abgelöst wird.

Nach den bisherigen Beobachtungen können wir uns jetzt ein Bild über eine voll entwickelte Kultur machen. Doch die erhaltenen Zahlen für die einzelnen Organe ohne weiteres miteinander zu vergleichen, würde den Tatsachen nicht ganz gerecht werden. Durch das kreisförmige Wachstum nimmt der Pilz ja, je weiter er nach außen vorrückt, eine immer größere Fläche ein, so daß sich die gebildeten Organe auf immer größere Abstände voneinander verteilen können. Wesentlich ist jedoch, ob an jedem Punkt der Kulturen gleich viel Organe entstehen oder ob irgendwie eine Abnahme in der einen oder anderen Richtung zu verzeichnen ist. Deshalb war es ratsam, die Anzahl der auf gleichen Flächen

gebildeten Organe zu vergleichen. Es wurde daher die Zahl der Organe berechnet, die auf einer Fläche von 10 mm² in jedem Ring vorhanden ist. Bei dieser Berechnung wurden stets zwei aufeinander folgende 1 mm-Ringe miteinander vereinigt.

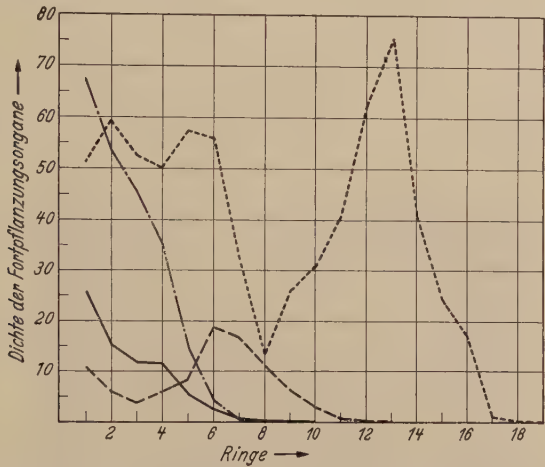


Abb. 10. Dichte der Fortpflanzungsorgane in den einzelnen Ringen einer Kultur.
 — Pyknidien; — — — äußere Pseudothecien; - - - innere Pseudothecien; Chlamydosporen.

Betrachten wir an Hand von Abb. 10 nacheinander das Verhalten sämtlicher Organe. Die Pyknidien sind demnach in der Mitte einer Kultur am dichtesten gelagert. Ihre Dichte nimmt ziemlich gleichmäßig nach außen hin ab. Im zehnten 2 mm-Ring hatte bei unseren 10 Kulturen jegliche Pyknidienbildung aufgehört. Auch die Pseudothecien liegen im Zentrum der Kultur dichter beieinander als in den beiden folgenden Ringen. Vom vierten Ring an drängen sie sich mehr zusammen und erreichen im sechsten Ring ihre größte Dichte. Von da ab wird ihr gegenseitiger Abstand wieder ganz allmählich größer, bis im 13. Ring schließlich keine Pseudothecien mehr zu finden sind. Die auf den Pyknidien befindlichen Pseudothecien richten sich in ihrer Verteilung ziemlich genau nach den Pyknidien. Wie diese liegen sie in der Mitte der Kulturen am dichtesten zusammen. Der Besatz einer Pyknidie ist allerdings, wie aus Abb. 11 hervorgeht, im dritten Ring am größten. Dort sind im Durchschnitt fast vier Pseudothecien auf jeder Pyknidie zu finden. Die Chlamydosporen schließlich sind ebenfalls in der Mitte ziemlich dicht gelagert.

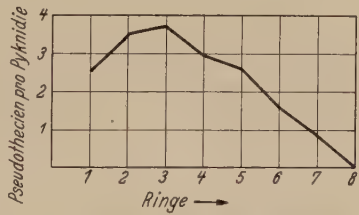


Abb. 11. Zahl der auf den Pyknidien gebildeten Pseudothecien in ihrer Verteilung über eine Kultur.

Ihre Dichte nimmt aber nach einem kleinen Optimum im fünften und sechsten Ring sehr schnell ab, bis im achten Ring ein tiefster Wert erreicht ist. Danach steigt die Dichte ununterbrochen bis zum 13. Ring an, wo mit rund 75 Chlamydosporen je 10 mm^2 die dichteste bei allen Organen überhaupt auftretende Lagerung vorkommt. Fast ebenso schnell werden es nach außen wieder weniger. Im 19. Ring, dem letzten auf dem Filtrierpapier, hatte die Organbildung ihr Ende erreicht.

Aus den Ausführungen geht demnach einwandfrei hervor, daß in den Kulturen eine gewisse Zonierung zu beobachten sein muß. Tatsächlich

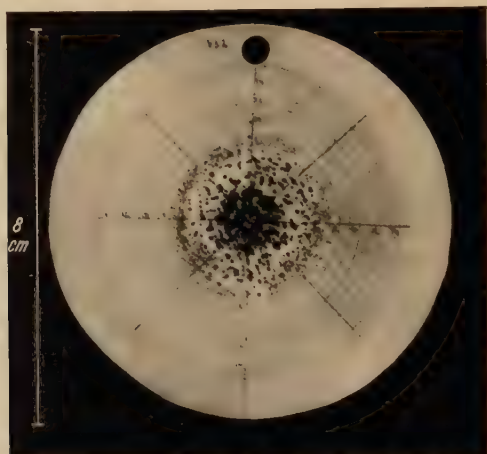


Abb. 12. Photographische Wiedergabe einer während der Pseudothecienphase aufgenommenen Kultur (mit 2 mm Ringeinteilung).

lassen sich schon makroskopisch diese Zonen, die den einzelnen Phasen entsprechen, erkennen. Abb. 12 zeigt eine Kultur, die während der Pseudothecienphase aufgenommen wurde. Deutlich sichtbar ist das innere, sich nach außen auflockernde Gebiet der Pyknidien zu erkennen. Daran schließt sich, ziemlich scharf abgegrenzt, die Pseudothecienzone.

Bei dem Übergang des Pilzes von einer Phase in die andere ist offenbar eine gesteigerte Aktivität vorhanden. Dieser Schluß läßt sich wohl aus der Tatsache ziehen, daß zu Beginn einer Phase eine gewisse Anzahl von Organen der folgenden Phase mit entstehen. Dabei bleibt ihr zahlenmäßiger Anteil solange gering, bis das Optimum der vorhergehenden Phase überschritten ist. Durch diese höhere Aktivität läßt sich möglicherweise die anfänglich hohe Dichte der Pseudothecien in den inneren Ringen erklären. Dafür spricht wohl auch das Zusammenfallen der Entstehung der inneren Pseudothecien mit dem Auftreten der Chlamydosporen.

Eine abschließende Diskussion der Ergebnisse soll erst nach weiterer Klärung des vorliegenden Fragenkomplexes erfolgen.

Für die wertvolle Hilfe, besonders für die auch oft nachts durchgeführten Zählungen, möchte ich auch an dieser Stelle Frl. M. HELLMUTH herzlich danken.

Zusammenfassung.

Die Bildung der Fortpflanzungsorgane erfolgt bei *Mycosphaerella pinodes* in drei Phasen. Auf eine Pyknidienphase folgt eine Pseudothecienphase, die schließlich von einer Chlamydosporenphase abgelöst wird.

In der ersten, der Pyknidienphase, entstehen Pyknidien, die nacheinander das Stadium der Vorreife und Reife durchlaufen.

In der zweiten, der Pseudothecienphase, bilden sich in zwei aufeinander folgenden Zeitabschnitten zunächst die äußeren sich auf der Substratoberfläche, dann die inneren sich auf den Pyknidien entwickelnden Pseudothecien.

In der dritten, der Chlamydosporenphase, läßt sich eine Ausbreitungsphase von einer Vermehrungsphase trennen.

Entscheidend wichtig scheint zu sein, daß die Bildung der Organe jeder Phase bereits in geringer konstanter Menge in der vorhergehenden Phase einsetzt.

Literatur.

JONES, L. K.: Studies of the nature and control of blight, leaf and pod spot, and footrot of peas caused by species of *Ascochyta*. Geneva Agr. Exp. Sta. Bull. 547, 3 (1927). — LUDWIG, O.: Untersuchungen an *Ascochyta pisi* Lib. Beiträge zur Biologie der Pflanzen 16, 465 (1928). — SÖRGEL, G.: Über eine neue Kulturmethode für Mikroorganismen. Der Züchter 21, 322 (1951); Über die Ursachen der unterschiedlichen Resistenz verschiedener Erbsensorten gegenüber den Fußkrankheits-erregern *Ascochyta pisi* Lib., *Ascochyta pinodella* Jones und *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox.) Stone. I. Vergleichende Untersuchungen zum Verhalten der Pilze auf einer stark und einer schwach anfälligen Sorte. Der Züchter 22, 4 (1952). — WEHLBURG, C.: Onderzoekingen over Erwtenanthraknose. Proefschrift, Baarn. 63 S. (1932).

(Aus dem „Departamento de Micologia“ des „Instituto Botânico“, Lissabon.)

Zur Kenntnis von *Kloeckera Lodderi* sp. nov.*.

Von

N. VAN UDEN und L. ASSIS-LOPES.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 6. Mai 1953.)

Aus portugiesischem Sauerteig und von der Haut einer nicht identifizierten Raupe isolierten wir je einen Stamm einer asporogenen Apiculatushefe, die hauptsächlich auf Grund ihrer physiologischen Eigenschaften nicht in einer der bisher beschriebenen Hefearten (siehe LODDER und KREGER-VAN RIJ) untergebracht werden konnte. Wir betrachten daher die beiden Stämme als Vertreter einer neuen Art, für welche wir, der niederländischen Mykologin Frau Dr. J. LODDER zu Ehren, den Namen *Kloeckera Lodderi* vorschlagen.

Eigenschaften von *K. Lodderi*.

Mikroskopische Morphologie. Nach 24 Std Wachstum bei 25° C in einer Nährlösung mit 2% d-Glucose, 1% Pepton und 0,2% Hefeextrakt findet man ovale (1,7—2,6) × (2,6—3,3) μ und citronenförmige (2—3,3) × (4—6,6) μ messende Zellen (Abb. 1). Die Sprossung ist bipolar.

Pseudomycel wird nicht gebildet. Sporen wurden nicht beobachtet.

Makroskopische Morphologie. In einer Nährlösung mit 2% d-Glucose, 1% Pepton und 0,2% Hefeextrakt bildet sich nach 24 Std lediglich ein Bodensatz. Auch später werden weder ein Ring noch eine Haut gebildet. Nach 30 Tagen Wachstum bei 25° C auf Sabouraud-Agar mit Zusatz von 0,5% Hefeextrakt ist die Strichkultur cremefarbig, weich, glänzend und glatt.

Alkoholgärung. Für den Nachweis der Gasbildung verwendeten wir die Methode von LANGERON u. GUERRA in der Modifikation von PEREIRA MIGUENS. d-Glucose wird von *K. Lodderi* vergoren, d-Galaktose, Saccharose, Maltose und Lactose dagegen nicht.

Abb. 1. Zellen von *Kloeckera Lodderi* aus einer 24 Std alten Kultur in einer Nährlösung. Zeichnung nach einem ungefärbten Präparat. Vergr. \pm 2400 fach.

Zuckerveratmung. Bei Prüfung nach der Methode von WICKERHAM und BURTON wurden d-Glucose und Saccharose von *K. Lodderi* als C-Quelle verwendet, d-Galaktose kaum, Maltose und Lactose dagegen nicht. Aus Analogiegründen

* Die Durchführung dieser Arbeit wurde durch die finanzielle Unterstützung des „Instituto de Alta Cultura“ (Lissabon) ermöglicht.

bewerteten wir die Galaktoseveratmung, sofern wir sie zur Klassifikation der untersuchten Hefe heranzogen, als negativ; wir werden auf diesen Punkt in der Diskussion zurückkommen.

N-Assimilation. Nach der Methode von WICKERHAM verwendet *K. Lodderi* Ammoniumsulfat gut, Kaliumnitrat jedoch schlecht. Hier gilt dasselbe, was bereits bei der Galaktoseveratmung gesagt wurde.

Äthylalkoholveratmung. In der WICKERHAMschen Nährlösung für die Prüfung der C-Assimilation mit Äthylalkohol (3%) als einziger C-Quelle wächst *K. Lodderi* nur äußerst gering.

Diskussion; Umgrenzung von K. Lodderi.

Bekanntlich zieht man die Fähigkeit oder Unfähigkeit der verschiedenen Hefen, gewisse Zuckerarten sowie Nitrat als einzige C-Quelle bzw. N-Quelle zu verwenden, zu ihrer Klassifikation heran.

Bei den Methoden von WICKERHAM u. BURTON (für die Zuckerveratmung) und von WICKERHAM (für die Nitratassimilation) erfolgt die Prüfung durch Impfung der zu untersuchenden Hefe in eine Nährlösung, welche die jeweilige Zuckerart oder Kaliumnitrat als einzige C-Quelle bzw. N-Quelle enthält. Um den Einfluß der Nahrungsreserven des Inoculums auszuschalten, wird nach einigen Tagen in frische Nährlösung übergeimpft, und die Subkultur kommt nach spätestens drei Wochen zur endgültigen Beobachtung. Dazu wird die gewachsene Hefe suspendiert und die auftretende Trübung als Gradmesser für das erfolgte Wachstum genommen. Die Trübung wird photometrisch oder mit dem Augenmaß erfaßt.

Dabei können dreierlei Ergebnisse auftreten: eindeutig positiv (starke Trübung), eindeutig negativ (keine Trübung), zweifelhaft (geringgradige bis mäßige Trübung). Natürlich sind die „zweifelhaften“ Ergebnisse nur insofern zweifelhaft, als man sie für taxonomische Zwecke verwerten will; im übrigen muß man annehmen, daß eine mäßige Trübung eben einer mäßigen Assimilation entspricht. An Hand von rund 150 Hefestämmen, die wir in der letzten Zeit isolierten und klassifizierten, sind wir zu der Einsicht gelangt, daß die Hefearten, die in der taxonomischen Literatur als unfähig gelten, eine gewisse Zuckerart oder Nitrat zu verwenden, in zwei Gruppen zerfallen: diejenigen, die augenscheinlich nicht verwenden und diejenigen, die mehr oder weniger schlecht verwenden. Dabei scheint das Nichtverwenden oder das Schlechtverwenden wenigstens stammspezifisch zu sein: d. h. ein Stamm, der etwa ein zweifelhaftes Ergebnis bei der Prüfung der Galaktoseveratmung ergibt, zeigt das gleiche zweifelhafte Ergebnis bei wiederholter Prüfung.

Wenn man die Nährlösungen nach WICKERHAM und nach WICKERHAM u. BURTON mit *K. Lodderi* beimpft, so ist nach zwei Tagen in den Röhren, die Nitrat, Glucose, Galaktose oder Saccharose enthalten, eine mäßige Trübung feststellbar, während in den Röhren mit Maltose oder Lactose augenscheinlich keinerlei Wachstum auftritt. Im Laufe von drei Wochen ändert sich dieses Bild, indem die Trübung in den Röhren mit

Glucose oder Saccharose ständig zunimmt, während die Trübung in den Röhren mit Nitrat oder Galaktose nicht intensiver wird und in den Maltose oder Lactose enthaltenden Röhren auch weiterhin kein sichtbares Wachstum erfolgt. Beide Stämme von *K. Lodderi* verhielten sich identisch.

Daß wir trotzdem bei der Beschreibung von *K. Lodderi* die Assimilation von Nitrat und die Galaktoseveratmung als negativ angeben, geschieht, um keine Verwirrung zu stiften, weil sonst der Eindruck erweckt werden könnte, daß *K. Lodderi* diese Substanzen zum Unterschied von anderen *Kloeckera*-Arten verwenden könne, was aber nicht der Fall ist. So verhalten sich zum Beispiel unsere drei Stämme von *K. apiculata* Nitrat und Galaktose gegenüber in ähnlicher Weise wie die beiden Stämme von *K. Lodderi*. Es gilt jedoch *K. apiculata*, wie übrigens alle anderen bisher bekannt gewordenen *Kloeckera*-Arten, als unfähig, Nitrat und Galaktose zu verwenden. Nur im Rahmen einer Revision der gesamten Gattung könnte daher die taxonomische Verwertung dieser Phänomene in Betracht gezogen werden.

Wie bereits angedeutet, findet man auch bei Hefen aus anderen Gattungen ähnliche Erscheinungen. So gelten z. B. sowohl *Candida albicans* als auch *C. Castellanii* als unfähig, Nitrat als einzige N-Quelle zu verwenden. Doch weisen unsere sieben Stämme von *C. albicans*, verglichen mit unseren zwei Stämmen von *C. Castellanii*, in der WICKERHAMschen Nährlösung für die Prüfung der Nitratassimilation ein deutliches Mehrwachstum auf. Unser Stamm von *Trichosporon Behrendii* weist ein geringes Wachstum mit Lactose als einzige C-Quelle auf, während mit unserem Stamm von *Torulopsis Pintolopesii* und mit den oben erwähnten Stämmen von *Kloeckera apiculata* und *K. Lodderi* keinerlei Wachstum erfolgt; alle vier Arten gelten aber als unfähig, Lactose zu veratmen.

Es handelt sich gewiß um Phänomene weitester Verbreitung bei den Mikroorganismen. Schon bei den Hefen findet man bei der Alkoholgärung ähnliches, indem gewisse Zucker von gewissen Hefen nur zum geringsten Teil vergoren werden, und ORLA-JENSEN zum Beispiel erwähnt ähnliches für die Milchsäuregärung durch *Lactobacteriaceae*. Man fragt sich, weshalb diese kaum angelaufenen metabolischen Vorgänge (wie Nitratreduktion, Galaktoseveratmung usw.) plötzlich in den Kinderschuhen stecken bleiben. Treten etwa Hemmstoffe auf, die gewisse Enzyme blockieren? Läßt sich diese etwaige Hemmung unter geeigneten Bedingungen aufheben? Wir müssen uns zur Zeit auf den kurzen Bericht der erwähnten Beobachtungen beschränken, wollen aber gerne eventuellen Interessenten repräsentative Hefestämme als Untersuchungsmaterial zur Verfügung stellen.

Nun zurück zur *K. Lodderi*. Als asporogene Hefe mit bipolar sprossenden, zum Teil zitronenförmigen Zellen muß *K. Lodderi* der Gattung *Kloeckera* Janke zugerechnet werden. Die alleinige Vergärung von Glucose hat *K. Lodderi* mit *K. apiculata*, *K. africana* und *K. magna*

gemein, doch unterscheiden sich diese drei Arten von *K. Lodderi* durch die Zuckervertatmung, indem keine nur Glucose und Saccharose vertatmet. *K. Lafarii*, *K. antillarum*, *K. javanica* und *K. Jensenii* vertatmen wie *K. Lodderi* nur Glucose und Saccharose, vergären aber alle zum Unterschied von *K. Lodderi* Saccharose. *K. corticis* endlich unterscheidet sich sowohl durch die Zuckervertatmung als auch durch die Vergärung von Maltose.

K. Lodderi ist somit deutlich von den acht bisher beschriebenen *Kloeckera*-Arten verschieden; mit der nachfolgenden Umgrenzung sei sie ihren Gattungsgenossinnen angereiht.

Kloeckera Lodderi sp. nov.

Cellulae apiculatae vel ovoideae $(1,7-3,3) \times (2,6-6,6) \mu$. Sedimentum in medio liquido formatur. Fermentat dextrosam, non vero galactosam, saccharum, maltosum, lactosum. Assimilat dextrosam et saccharum, non vero galactosum, maltosum, lactosum et alcohol aethylicum. Nitras kalii non assimilatur. Cultura in agarum cum dextroso et peptono et extracto levedinis post unum mensem sub 25° C. apparet flavido-alba, mollis, nitens et glabra.

Zellen citronenförmig oder oval $(1,7-3,3) \times (2,6-6,6) \mu$. In flüssigen Nährmedien bildet sich nur ein Bodensatz. d-Glucose wird vergoren, d-Galaktose, Saccharose, Maltose und Lactose jedoch nicht. d-Glucose und Saccharose werden vertatmet, d-Galaktose, Maltose, Lactose und Äthylalkohol jedoch nicht. Kaliumnitrat wird nicht verwendet. Die Strichkultur auf Sabouraud-Agar mit 0,5% Hefeextrakt ist nach einem Monat bei 25° C cremefarbig, weich, glänzend und glatt.

Als Typus dieser Art nehmen wir den aus Sauerteig isolierten Stamm. Er wird im „Departamento de Micologia“ des „Instituto Botânico“ zu Lissabon unter der Nummer 2441 in Kultur gehalten. Eine Subkultur wurde bei der Hefeabteilung des „Centraalbureau voor Schimmelcultures“ zu Delft deponiert.

Zusammenfassung.

Für eine aus Sauerteig und von einer Raupe isolierte neue Hefeart wird der Name *Kloeckera Lodderi* vorgeschlagen. *K. Lodderi* hat ovale und citronenförmige Zellen. Pseudomycel wird nicht gebildet. In flüssigen Nährmedien wird nur ein Bodensatz gebildet. Die Strichkultur ist cremefarbig, weich, glänzend und glatt. Nur d-Glucose wird vergoren. d-Glucose und Saccharose werden ausgiebig vertatmet, während d-Galaktose nur geringfügig und Maltose, Lactose sowie Äthylalkohol nicht vertatmet werden. Mit Kaliumnitrat als einziger N-Quelle erfolgt mäßiges Wachstum. In der Diskussion wird begründet, warum die Verwendung von d-Galaktose und Kaliumnitrat durch *K. Lodderi* für die Beschreibung dieser Hefe als negativ bewertet wird. Beobachtungen der Verfasser zufolge zerfallen die Hefen, welche in der taxonomischen Literatur als unfähig gelten, gewisse Zuckerarten und Nitrat zu assimilieren, in zwei

Gruppen: Hefen denen diese Fähigkeit wirklich abgeht und Hefen, bei denen die begonnene Assimilation aus unbekannten Gründen frühzeitig zum Stillstand kommt. Beispiele werden gegeben.

Literatur.

LANGERON, M., et P. GUERRA: Ann. de Parasitol. **16**, 36 (1938). — LODDER, J., and N. J. W. KREGER-VAN RIJ: The Yeasts. Amsterdam: North Holland Publishing Company 1952. — ORLA-JENSEN, S.: The Lactic Acid Bacteria. Kopenhagen: Ejnar Munksgaard 1943. — PEREIRO MIGUENS, MANUEL: Actas Dermo-sifiliograficas **41**, 89 (1949). — WICKERHAM, L. J.: J. Bacter. **52**, 293 (1946). — WICKERHAM, L. J., and K. A. BURTON: J. Bacter. **56**, 363 (1948).

(From the Cytogenetics Laboratory, Department of Biochemistry,
Indian Institute of Science, Bangalore-3.)

Studies on the Cytology of Yeasts.

X. Mitosis in the Riboflavin excreting Top Yeast Mutant.

By

Miss SARASWATHY ROYAN, M. Sc.

With 28 figures in the text.

(Eingegangen am 13. Mai 1953.)

The literature on yeast cytology is characterised by radical divergences in views regarding the identification of the various organelles in a budding yeast cell (LINDEGREN, 1951, 1952; SUBRAMANIAM, 1952).

At first sight it would appear as though these differences are irreconcilable, and one may well pose the question whether this is due to the cytological behaviour of yeasts being unique. To consider yeasts as exceptional in this respect, there should be clear evidence that orthodox methods of approach do not offer satisfactory answers. Remarkably enough such an approach to problems in yeast cytology has not been made by any school with the exception of that of SUBRAMANIAM (1945, 1946, 1947a, b, 1948a; SUBRAMANIAM and RANGANATHAN, 1945a, b; RANGANATHAN and SUBRAMANIAM, 1948, 1952; DURAISWAMI and SUBRAMANIAM, 1951; ROYAN and SUBRAMANIAM, 1951, 1952; DURAISWAMI, 1953).

Another factor which has added to the confusion in this field is the use of the terms "centrosomes" and "chromosomes" by different workers to refer to entirely different cell organelles. In some cases bodies so described (LINDEGREN, 1952) bear no similarity either in structure or in function to those identified as such in higher organisms. It is misleading to call a structure a "centrosome" when it does not play any role either in the formation or the orientation of the spindle in mitosis.

Investigators familiar with the accepted definitions given in text books and monographs (WILSON, 1904; SHARP, 1934; DARLINGTON, 1937; SCHRADER, 1946) would be surprised at the behaviour of the centrosome as described by LINDEGREN (1952): "At the first step in budding (Fig. 2d) the centrosome produces a small conical process which forces its way through the cytoplasm and erupts into the new bud (Fig. 2e). The nuclear vacuole puts out a process which enters the bud (Fig. 2f); the end of this process expands into the bud vacuole. The bud vacuole finally receives the chromosome complex, after which the connection between the bud and the mother vacuole is closed off" (p. 281). It is even more curious to note that all the above phenomena occur in the absence of any cytoplasm in the bud. When centrioles and centrosomes conforming to the definitions of such organelles in higher organisms have been recorded in yeasts (RANGANATHAN and SUBRAMANIAM, 1947), unconventional use of such terms is liable to perpetuate the confusion.

Apart from the misleading use of the terms having specific connotations, further complication is introduced by claiming the presence in yeast of a new structure called the "centrochromatin" (LINDEGREN, 1952) which has no counterpart in higher organisms. In a recent review, KAPLAN (1952) states: "In particular, it is not yet certain whether the two or four Feulgen positive granules visible during cell

fission are centriols [LINDEGREN and RAFALCO (168)] or chromosomes [DE LAMATER (65); SUBRAMANIAM et al. (84, 85, 277)]" (p. 65). It would appear that cytologists familiar with the work on higher organisms would experience no difficulties in distinguishing a chromosome from a centrosome.

Yeasts could be cultured in solid or liquid media under varying conditions of aero- or anaerobiosis. Cells in various stages of budding could be observed in young as well as old cultures whatever the cultural conditions may be. Are the cytological phenomena in budding yeast cells identical irrespective of (1) the age of the culture, (2) the nature of the nutrient medium or (3) the availability of oxygen? Without offering any answer to the above questions, attempts have been made, on the one hand, to belittle all work on yeast cytology (WINGE, 1951a, b), and on the other, to present a generalised diagram of the structures in an yeast cell (LINDEGREN, 1952). In the absence of an extensive survey of the cytological pictures observed during budding in cultures of varying ages and under differing environmental conditions, neither appears justified. The lack of an organised attack on the problem has led to presentation by one school of progressively differing opinions in a succession of papers (LINDEGREN, 1945a, b, 1949, 1952; LINDEGREN and LINDEGREN, 1946; LINDEGREN and RAFALCO, 1950).

a) Problems in Yeast Cytology.

Since budding takes place under a variety of physiological conditions it is too much to expect that the nucleus would behave in an identical manner in all these cases. In this connection attention may be drawn to the suggestions that fermenting yeast cells are comparable in their behaviour to the secretory tissue cells of higher animals (GUILLIERMOND, 1920) and that *differentiation* in a yeast colony "analogous to differentiation of the cells of higher organisms into tissues and organs" may possibly occur (PUNKARI and HENRICI, 1933, p. 127). At the time these suggestions were put forward, not much was known as to the cytological changes accompanying differentiation in higher organisms.

The present position in yeast cytology naturally provokes a comparison with what was a somewhat similar situation in higher plants and animals until very recently. HERTWIG's law of the constancy of the chromosome numbers in species had taken such deep roots that any exceptional finding was brushed away as unimportant. HUSKINS (1952) observes: "There were many factors involved in the gradual consolidation of the law of constancy of chromosome numbers. NĚMEC in 1904 and 1910 had discovered tetraploid nuclei in chloralized roots, but STRASBURGER (1907) was convinced that they could not persist and therefore were of no significance. He even explained away as obviously due to some 'disturbing influences, such as wounding by small animals etc.' his own discovery of rows of tetraploid cells in control roots. Of this WINKLER (1916) wrote (trans.): 'This last remark of STRASBURGER is extraordinarily characteristic. It shows that the conviction that in normal somatic tissues only diploid cells could occur has become a dogma under the influence of which the best plant cytologist comes at once to the opinion that the occurrence of tetraploid cells found therein must be pathological without even considering any other possibilities'" (p. 13).

However, as a result of recent investigations it is slowly becoming apparent that not all nuclei of the cells of an organism contain the same number of chromosomes. Many of the differentiated cells in an adult animal are polyploid, containing different multiples of the basic chromosome number. As WHITE (1951) so pertinently observes, the phenomenon of *endopolyploidy* accompanying tissue differentiation "passed unnoticed so long as cytologists only counted the chromosomes of cells in mitosis" (p. 208).

Are there in yeasts phenomena analogous to tissue differentiation in higher plants and animals? If so, are such changes accompanied by comparable cytological characteristics? That such questions have an immediate relevance to problems in yeast cytology and as such demand attention has not even been realised by some of the workers in this field (WINGE, 1951; LIETZ, 1951¹; LINDEGREN, 1952). While in the case of higher organisms it had been tacitly assumed until recently that every tissue of an animal irrespective of its structure and function would be made up of cells having the identical number of chromosomes, in regard to yeasts the assumption that the physiological conditions of culture cannot have any effect on the cytological behaviour of the organism appears to be prevalent. Normal mitosis has been observed only by a few (FUHRMANN, 1906; BADIAN, 1937; SUBRAMANIAM, 1946; RANGANATHAN and SUBRAMANIAM, 1948; ROYAN and SUBRAMANIAM, 1951; DURAISWAMI, 1953). The others have investigated only the cytology of fermenting yeast cells (LEVAN, 1947) or of samples of varying ages from wort cultures (NAGEL, 1946; LINDEGREN and RAFALCO, 1950) or agar slants or giant colonies. In fact, most of these latter publications, particularly those giving unorthodox interpretations (WINGE, 1951; LINDEGREN, 1952) give no details at all either as to the age of the material studied or of the cultural conditions employed.

The real problem in yeast cytology is, therefore, the discovery of the optimal conditions under which normal mitosis occurs in order that these may be used as the "standard" to evaluate the cytological changes undergone by the cells in different environments. Such difficulties are not encountered in higher organisms because it is only the "embryonic" or "meristematic" cell that divides while those in adult differentiated tissues divide but rarely, if at all.

b) A planned Programme of Work.

The question naturally arises as to the physiological conditions under which budding yeast cells are strictly comparable to the "meristematic" or "embryonic" cells of higher organisms. Normal mitosis of the nucleus with a basic chromosome number is exhibited by yeast when cultured in a medium undergoing active aeration (SUBRAMANIAM, 1946; RANGANATHAN and SUBRAMANIAM, 1948; DURAISWAMI and SUBRAMANIAM, 1951). It has to be presumed, therefore, that only material proliferating actively in vigorously aerated cultures would stand comparison with the pluripotent embryonic cells. Using this as the "standard" the complex cytological pictures observed in budding cells from fermenting cultures, agar slants and giant colonies were interpreted as the necessary concomitant of endopolyploidy. Endopolyploid nuclei when stimulated to divide show various types of abnormalities. The chromosomes often lie scattered in the cytoplasm, their segregation to the mother and bud is not equal and frequently more than two nuclei are reconstituted. There is also a peculiar type of "somatic reduction" resulting in the formation of a bud with the normal complement of chromosomes (PRAHLADA RAO and SUBRAMANIAM, 1952).

¹ Dr. LIETZ's results will be critically reviewed in a forthcoming publication from this laboratory incorporating our own results on some species of *Zygosaccharomyces*.

The significance of the above observations, though repeatedly emphasised, does not appear to have been grasped by other workers (WINGE, 1951a, b; LINDEGREN, 1952). Mitotically dividing nuclei are entirely different in structure and behaviour from endopolyploid ones which exhibit varying types of abnormality. SUBRAMANIAM (1946) identified chromosomes in yeast and described the phenomena of normal mitosis occurring in cells actively proliferating under aerobic conditions only on the basis of a close comparison with what occurs in meristematic tissue cells of higher plants. It was only subsequently that an interpretation was given of the complex pictures seen in cells from various other sources e. g. a fermenting culture (SUBRAMANIAM, 1947b, 1948b) or an agar slant (PRAHLADA RAO and SUBRAMANIAM, 1953). It will thus be apparent that the complicating factor in cytological investigations on yeasts is the widespread occurrence of endopolyploidy under a variety of physiological conditions.

Granting that yeast cytologists may not be aware of the recent advances in our knowledge of the behaviour of the nucleus during tissue differentiation (HUSKINS, 1952) or that they are unable to accept the existence of similar phenomena in yeasts, it was thought that critical proof for the occurrence of mitosis in yeasts could be offered from two entirely different angles. Our control two chromosome yeast, BY 1, is capable of utilising maltose along both the aerobic and anaerobic pathways. To ferment galactose, however, it requires a period of adaptation. Based on this characteristic a technique has already been devised for the study of normal mitosis avoiding almost completely the occurrence of endopolyploid cells (DURAI SWAMI and SUBRAMANIAM, 1951; DURAI SWAMI, 1953).

The second method of approach is based on the fact that certain yeasts are capable of using some sugars only through the aerobic pathway, being totally unable to ferment them. In our yeast culture collection there are several strains which besides being exclusively aerobic also excrete into the culture medium appreciable quantities of riboflavin. Most of these strains are derived from our control two chromosome brewery yeast, BY 1, but differ from it radically in their physiology. Unlike the control they are incapable of fermenting any of the sugars, and it appears that their ability to excrete riboflavin may be a direct consequence (MITRA, 1952a). A detailed study of BY 2, one of these strains, was, therefore taken up in the belief that cytological investigation of a completely aerobic yeast may offer a better insight into problems in yeast cytology. The inequality in the size of the two chromosomes in this strain (SUBRAMANIAM and RANGANATHAN, 1946) has rendered possible the presentation of critical evidence not only for the existence of the orderly phenomenon of mitosis in yeast (ROYAN and

SUBRAMANIAM, 1951) but also for the spontaneous occurrence of tetraploidy (ROYAN and SUBRAMANIAM, 1952). Extensive investigations on the physiological characteristics of this mutant yeast have already been made (PREMA BAI, 1947; MITRA, 1949, 1950, 1952a).

Technique.

The method of handling the top yeast for cytological study had to be different from that employed as a routine in this laboratory. Unlike the control yeast, this mutant has a tendency to be pseudomycelial. The following typical cell measurements give an idea of the variations in size and shape that this yeast undergoes:

Length of cell in μ	17.0	13.6	13.6	8.5	6.8	5.1	5.1	2.6
Width of cell in μ	4.3	4.3	3.4	3.4	2.6	3.4	2.6	2.6

Considerable difficulties were experienced in obtaining smears one cell layer thick. This was due to the pseudomycelial nature of the strain. To obviate this difficulty, the growing culture was shaken in an automatic rocker (MITRA, 1952b) for a period of three hours.

The modified procedure finally adopted for culturing the yeast was as follows: Bacteriological test tubes containing 5 ml. aliquots of malt wort of sp. gr. 1.02 and pH 4.6—4.8 were inoculated with a loop of material from a 24 hours old liquid culture and incubated at 31° C. After the lapse of 20 hours, the tubes were centrifuged, and the spent medium was poured out without disturbing the yeast settled at the bottom. After addition of 5 ml. of fresh wort and thorough shaking the contents were transferred to special rocker tubes (MITRA, 1952b) which were then mounted on the automatic shaker. At the end of three hours of shaking successive tubes were removed at five minutes' intervals. The yeast was separated from the medium by centrifugation, and the material so obtained was used for smearing. Being a top yeast, growth of the organism is limited to the surface of the medium, and centrifugation was therefore necessary at every step in order to avoid loss of the crop. Five slides were smeared at the end of every five minutes and this was continued for one hour. The smears were fixed in CARNOY's fluid for one hour and stained with HEIDENHAIN's haematoxylin using the long method. In finished preparations the cells had a slightly shrunken appearance. Further, difficulties were encountered during differentiation owing to the small size of the cells.

Correct fixation, quite apart from the method of staining adopted, is a vital factor in cytological investigations. The differing descriptions of the 'centrochromatin' in successive publications (LINDEGREN, 1951, 1952) have now been admitted to be the results of vagaries in fixation (LINDEGREN, 1952). SUBRAMANIAM investigated extensively the problem of a suitable fixative for use with yeasts and found that osmium tetroxide vapour gave the most satisfactory answer. This fixative has long been known to give perfect results (DARLINGTON and LA COUR, 1950 p. 36) because the proteins are not precipitated. BRETSCHNEIDER (1952) from his investigations on the influence of fixation on the ultra-structure of cell organelles concludes: "The highest degree of coagulation was found to be produced only by mixtures of formalin and osmium tetroxide preferably in combination with chromic acid, or potassium dichromate (p. 313)." The material fixed in this manner, according to him, differs very little from its natural state under living conditions. It is also to be noted that fixation with OsO_4 vapour has been one of the most popular methods employed for the demonstration of "nucleoids" in bacteria (ROBINOW, 1951).

Since fixation in Carnoy followed by staining with haematoxylin was found to be unsuitable for this material, reliance was placed on smears fixed in OsO_4 vapour and stained by the FEULGEN technique. Experiments revealed that the time schedule given by SUBRAMANIAM (1948a) for fixation as well as for the hydrolysis prior to staining was ideally suited for this material also. The intensity of staining could be improved by keeping the hydrolysed smears in the stain for a period of forty-eight hours.

Observations.

A glance at the photomicrographs would indicate that the mitotic behaviour of BY 2 bears a very close resemblance to that of the control, BY 1, as illustrated in the pictographic summaries of SUBRAMANIAM (1946) and DURAISWAMI (1953). This is hardly surprising in view of the fact that though derived from the control as a translocation mutant, this strain is still a diploid. Photo 1 shows three cells *A*, *B* and *C* in the early prophase stage, the nucleus in each case being composed of a Feulgen positive chromatin grain surrounded by a halo-like clear area. The chromatin particles in the three cells are of different sizes. In cell *B*, (Fig. 1)¹ it is rather small, while the ones in *A*, and *C* (Fig. 2) are almost double the size. The larger grains show in certain planes of observation a slightly chromophobic interior the reality of whose existence it is rather difficult to assess.

In the field illustrated as Photo 2, three stages in the 'division' or 'separation' of the initial chromatin mass into the two unequal early metaphase chromosomes could be seen. In cell *D* (Fig. 3), the constriction makes the chromatin mass appear like a dumb-bell shaped body. The 'separation' is apparently into two bodies of equal sizes. In cell *E* (Photo 2, Fig. 4), however, even though the constriction has not been followed by actual separation, the division is quite clearly unequal. If the stage in cell *D* is considered to be an early condition, it will then have to be presumed that before actual separation one of the bodies undergoes a differential contraction making the complement an unequal pair as in cell *F*.

The initial appearance of the nucleus as a clear area containing a central chromatin grain and the later 'division' or 'separation' of the latter to give rise to the two unequal early metaphase chromosomes have no exact parallel in the behaviour of the nucleus at these stages in the case of higher plants and animals. But, as will be shown in the discussion, a rational interpretation is possible if it is postulated that the initial chromatin grain is itself the result of a somatic synapsis during the telophase of the preceding division.

The typical pro-metaphase condition following the separation of the initial chromatin mass into the pair of unequal chromosomes is illustrated

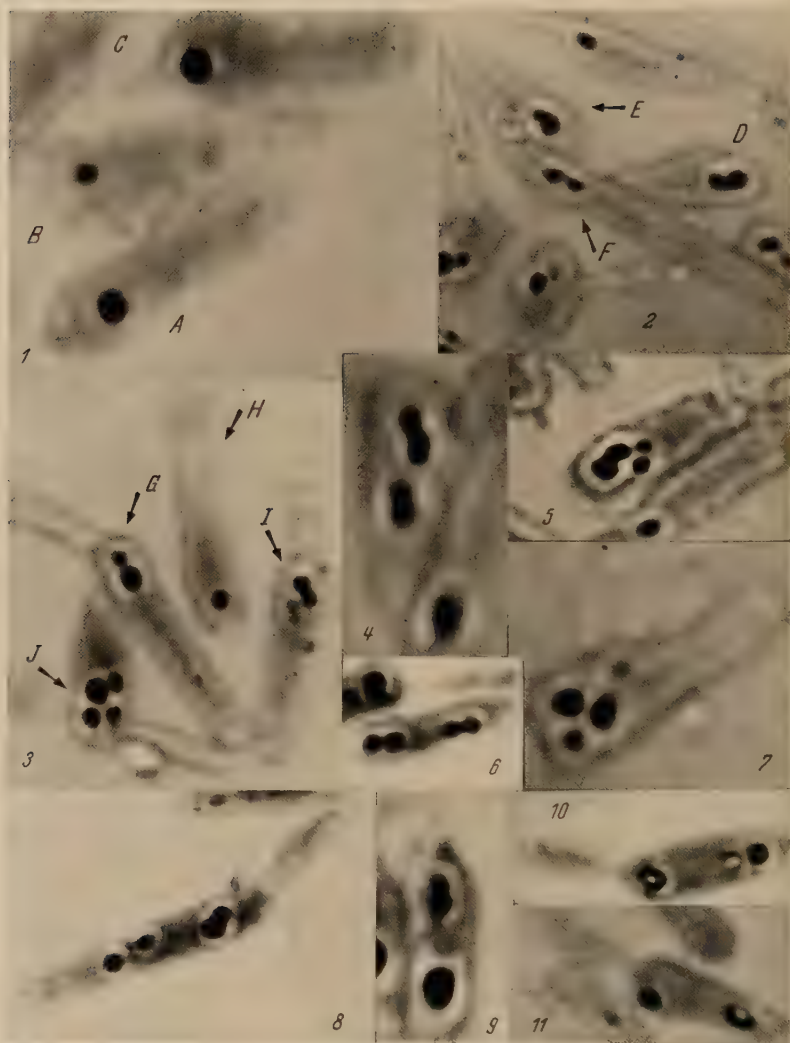
¹ Figures 1 to 27 were traced from enlargements taken at different magnifications.

in cell *G* in Photo 3 (Fig. 5). The difference in size of the two chromosomes is obvious. Even at this stage the cell is found to have developed already a bud of considerable size. Photo 3 also exemplifies the fact that a single field may contain cells in several stages of the mitotic cycle. Cell *H* is in the prophase condition while in cell *I* (Fig. 6) each of the two chromosomes appears dumb-bell shaped. The two lightly stained particles lying at the periphery of the cell *I* are artifacts, being extraneous matter stained with light green.

A similar stage without any artifacts is illustrated by Photo 4 (Fig. 7). The two chromosomes appear constricted but the difference in size is not quite apparent. This stage in which the two chromosomes present a dumb-bell shaped condition may be identified as the full metaphase. The synchronous appearance of the constriction in the two chromosomes which thus converts them into two pairs of chromatids is not followed by a similar simultaneous separation into daughter chromosomes to constitute the early anaphase. In Photo 5 (Fig. 8), the two chromatids of the small chromosome have separated giving rise to two small daughter chromosomes, while the chromatids of the big chromosomes still retain their association. It appears, therefore, that there may be a time lag in the separation of the constituent chromatids of the two chromosomes. The linear arrangement of the chromatids is seen in Photo 6 (Fig. 9). It is interesting to note that in this cell the members constituting a pair are identical in size.

Attention may be drawn to a very significant difference in the mode of constitution of the pro-metaphase and the full metaphase. The 'division' of the early prophase chromatin grain gives ultimately rise to the unequal pair of chromosomes seen in pro-metaphase (*G* in Photo 3; Fig. 5). Splitting of the chromosomes during full metaphase, however, involves exact replication of each of the two unequal chromosomes (cell *I* in Photo 3; Photos 5 and 6; Figs. 8 and 9). The bigger chromosome in the unequally sized pair divides into two chromatids of identical size which in anaphase become the pair of bigger chromosomes. A similar behaviour is also exhibited by the smaller chromosome. In other words, as is to be expected in the division of a nucleus by mitosis, chromosome reproduction results in the production of exact copies.

In early anaphase, therefore, the two unequal pairs have a characteristic disposition as is illustrated in Photo 3, cell *J* (Fig. 10). This orientation could be easily derived from the arrangement of the dumb-bell shaped chromosomes in cell *I* (Fig. 6) and in Photo 5 (Fig. 8). Variations of the arrangement of chromosomes in anaphase are capable of being correlated with the types of orientation assumed by the metaphase chromosomes. It is most likely that the very small width of the cell in relation to its length, as well as the different orientations which



Description of photomicrographs.

1. Early prophase. Cell *B* ($6.1\ \mu$) — Initial appearance of the chromatin grain. Note the increase in size of the chromatin grain in cells *A* and *C* ($5.3\ \mu$). — 2. Mid-prophase. *D* ($5.3\ \mu$) — Separation of the chromatin mass into two equal sized bodies. *E* ($5.7\ \mu$) — Differential contractions making the complement an unequal pair. *F* ($11.4\ \mu$) — Pro-metaphase; a sequel to stage in *E*. — 3. *G* ($8\ \mu$) — Pro-metaphase; the difference in the size of the chromosomes is distinct. *H* ($6.6\ \mu$) — Early prophase. *I* ($6.6\ \mu$) — Full metaphase; exact replication of each chromosome. *J* ($5.3\ \mu$) — Early anaphase; the arrangement of the four daughter chromosomes could be derived from *I* and Photo 5. — 4. Full metaphase ($7\ \mu$). — 5. Meta-anaphase ($6.1\ \mu$). Lack of synchronisation of chromatid separation. The two small chromosomes are lying apart while the chromatids of the larger chromosome retain their association. — 6. Full metaphase ($5.3\ \mu$). The members constituting a pair are identical in size. — 7. Early anaphase ($8\ \mu$). — 8. Post anaphase ($7.9\ \mu$). Synapsis of the unequal pair of chromosomes lying near the bud. The second daughter nucleus will be formed by

the cells assume as a result of smearing, are the two factors responsible for the varying dispositions assumed by the chromosomes in anaphase.

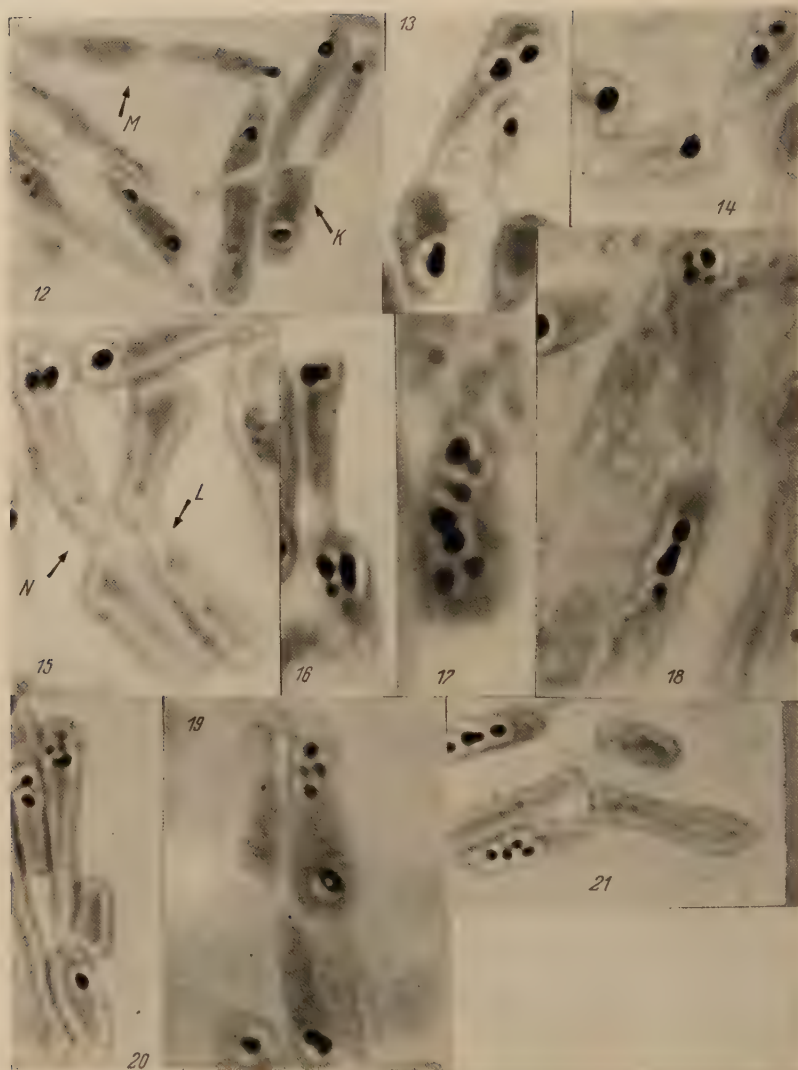
A cross-like arrangement of the chromosomes in early anaphase (Photo 7; Fig. 11) is obtained when the planes in which the two meta-



Description of figures in the text.

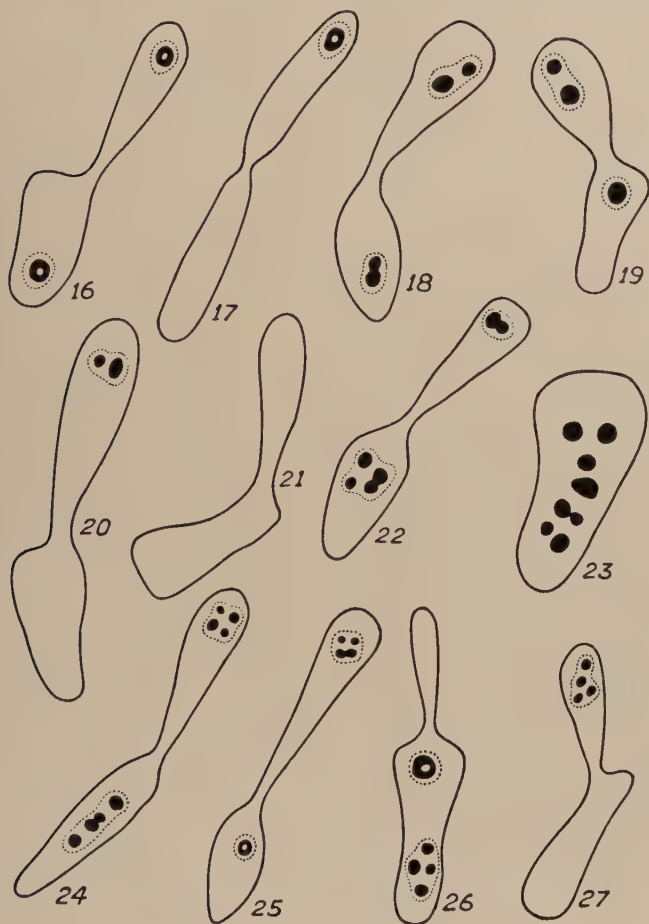
phase chromosomes divide are at right angles, and when the separations of the daughter chromosomes are not synchronous. A peculiar feature of this cell is that it possesses two horn-like projections suggestive of

the fusion of the other pair. — 9. Post anaphase (5.3μ). A reconstituted nucleus is seen at the free end of the cell. The unequal pair near the bud is just synapsing. — 10. Post anaphase stage (5.3μ). — 11. Telophase (5.3μ). Simultaneous formation of two daughter nuclei. — (Numbers within brackets denote the longest diameter.)



12. Telophase. *K* — Synchronisation of the telophasic changes in the mother (7μ) and bud (8.8μ). *M* — Such a synchronisation is lacking; the nucleus in the mother cell (8.8μ) has lapsed into the resting condition. The bud (8.8μ) shows a reconstituted nucleus. — 13. The chromosomes in the mother cell (3.5μ) are in the process of fusion, while those in the bud (5.3μ) are still discrete. — 14. A sequel to stage in Photo 13. Chromosome fusion completed in mother cell (3.5μ). — 15. *N* — Post anaphase — The resting nucleus in the mother cell (5.3μ) shows no positive FEULGEN reaction. The chromosomes are still discrete in the bud (6.6μ). *L* — Resting stage. Mother cell (4.4μ); bud (5.3μ). — 16. The synapsing pair of chromosomes in the bud (3.5μ) belongs to the previous division. The mother cell (2.5μ) is at post anaphase stage. One pair of chromosomes has synapsed while the other unequal pair is yet to do so. — 17. Early anaphase of a spontaneously occurring tetraploid (5.1μ). The difference in the size of the chromosomes is not apparent in the lower quartet. — 18. Post anaphase of a tetraploid. One set of daughter chromosomes still exhibiting marked size differences has moved into the bud (9.1μ). The telophasic change

the possibility of two buds developing simultaneously. If such be the case, an extra division of one of the chromosome complements would be necessary if the proper chromosome number of the organism is to be



maintained. Reference to the pictographic summary (Fig. 28) would give an idea of the derivation of the anaphase illustrated in this photograph.

The cell in Photo 8 (Fig. 12) is illustrative of the characteristic inequality in the size of the constituent chromosomes in the two pairs and also offers a basis for the notion that reconstitution of a nucleus in

are just commencing in the mother cell (9.6μ). — 19. Post anaphase of a tetraploid. Four chromosomes are seen at the free end of the cell (5.1μ). The nucleus reconstituted from the other group is lying near the bud (3.4μ). — 20. Post anaphase of a tetraploid. Mother cell (3.1μ); bud (8.8μ). — 21. Post anaphase of a tetraploid. An extreme condition where the bud (6.6μ) has four chromosomes while the nucleus in the mother cell (7.9μ) is in the resting condition. — (Numbers within brackets denote the longest diameter.)

telophase is by synapsis of the two chromosomes. The unequal pair of chromosomes lying at the free end of the cell are yet to synapse as a prelude to constituting the second daughter nucleus. It appears likely that the nucleus in the process of reconstitution near the bud end of the cell would finally migrate into the bud. A slightly more advanced stage is presented as Photo 9 (Fig. 13). One pair of chromosomes has already synapsed, giving rise to the characteristic reconstituted nucleus consisting of the chromatin mass surrounded by the halo-like hyaline region. The other pair, lying near the bud is undergoing synapsis as a prelude to forming the nucleus. The absence of any synchronisation in the telophasic reconstitution of the nuclei from the two pairs of chromosomes is further illustrated by the cell in Photo 10 (Fig. 14), whereas Photo 11 (Fig. 15) serves to show that there is sometimes simultaneous formation of the two nuclei. Photo 11 could therefore be taken as an example of the conventional telophase.

It is very difficult to decide whether the nuclear configuration in *K* in Photo 12 (Fig. 16) is the result of the migration of one of the two nuclei reconstituted simultaneously during a conventional telophase or whether the bud actually received only a pair of chromosomes which subsequently synapsed synchronously with the pair in the mother cell. The sequel to the above stage is illustrated by *L* in Photo 15 (Fig. 21), where the mother cell as well as the bud have entered the resting or interkinetic condition in as much as they are devoid of any Feulgen positive organelles.

Synchronisation of the telophasic changes at the end of anaphase, as described above, is, however, a rare phenomenon. Usually wide variations in the onset of these alterations appears to be the rule. Such behaviour is exemplified in *M* in Photo 12 (Fig. 17) and in Photos 13, 14, and in *N* in Photo 15. While the two chromosomes in the mother cell in Photo 13 (Fig. 18) are in the process of synapsis, the pair in the bud are still discrete. The sequel to this situation is seen in Photo 14 (Fig. 19) where fusion of the two chromosomes has been completed in the mother cell, the pair in the bud continuing to lie apart. These latter maintain the inequality in size as in early anaphase. The extreme condition is seen in Photo 15 (*N*; Fig. 20) in which the mother cell already indicates through the absence of any Feulgen positive structure its entry into the resting stage. The bud still retains two discrete chromosomes. What is presumably the next step is illustrated as *M* in Photo 12 (Fig. 17), the bud having a reconstituted nucleus, whereas the mother cell is bereft of any stained structures.

The presence of two chromosomes in the bud (Photo 16; Fig 22) which appear to be undergoing synapsis as a prelude to reconstituting the nucleus, and of a pair of discrete chromosomes of unequal size as

well as a dumb-bell shaped, elongate body in the mother cell is apt to be misleading at first sight. However, in attempting to understand the significance of this configuration, it should be borne in mind that (1) in this organism cell divisions occur in quick succession and (2) the timing of the telophase changes shows wide disparity. It would appear, therefore, that even before the Feulgen-positive material in the bud has undergone reorganisation into a nucleus, an additional mitosis has occurred in the mother cell. That the arrangement seen in the latter is not representative of meta-anaphase would be evident from the fact that in metaphase the big chromosome always produces only its own replica (cf. Photos 5 and 6; Figs. 8 and 9) and *not* the small one. The presence of a discrete pair of unequal chromosomes in addition to the dumb-bell shaped body can only mean that anaphase is already over, and that of the resultant two pairs of unequal chromosomes one is undergoing synapsis, while the other has not yet started this process. This abnormal nuclear condition would presumably be remedied by the production of another bud by the mother cell, soon after the one already in existence separates from it. That such a possibility is not far fetched becomes evident on perusal of Photo 7 (Fig. 11) which pictures a cell with two horn-like buds projecting out of it.

The occurrence of such precocious anaphases could be made the starting point for a description of the phenomenon of spontaneous tetraploidy already reported by ROYAN and SUBRAMANIAM (1952). On the basis of extensive investigations on the effect of polyploidogenic agents on the control BY 1 (SUBRAMANIAM, 1945, 1947a; SUBRAMANIAM and KRISHNAMURTHY, 1949; RANGANATHAN and SUBRAMANIAM, 1950; RANGANATHAN, 1950; MITRA and SUBRAMANIAM, 1950; SUBRAMANIAM and SREEPATHI RAO, 1952) it was suggested that for the isolation of a stable tetraploid there should not only be a doubling of the chromosome number, but that a gene mutation stabilising the doubled chromosome complement and enabling it to function harmoniously should also occur. Spontaneous tetraploidy has been observed in the control diploid brewery yeast also (DURAI SWAMI, 1953). Whether such chromosome doubling yields a stable tetraploid depends on the occurrence of the stabilising mechanism. It was argued that the mother cell in Photo 16 (Fig. 22) would revert to the diploid condition by putting forth another bud, thus enabling the extra chromosomal complement to move into it. The alternative of a cell type with two pairs of chromosomes of unequal size can occur only if the above mentioned gene mutation comes to pass.

Critical cytological evidence for spontaneous doubling of the chromosome number can only be an anaphase. The eight daughter chromosomes arranged in two groups in the cell in Photo 17 (Fig. 23) indicating, as they do, an early anaphase stage, offer such a proof. When a somatic

doubling takes place in this diploid top yeast, the four chromosomes should form two unequal pairs. If each of these produces its replica, then at early anaphase the segregation would result in two groups, each composed of two pairs of unequal daughter chromosomes. This size difference is apparent in the upper group, though in the lower one all the chromosomes have nearly the same size.

As in the diploid, in the tetraploid so also, one set of daughter chromosomes (Photo 18, Fig. 24) may move into the bud even before the changes characteristic of telophase are initiated. The orientation of the chromosome complements in the mother cell and the bud appears to be the culmination of the anaphase movement in the tetraploid. While the four chromosomes in the bud, two big and two small, still retain their individuality, in the mother cell one of the two pairs of unequal chromosomes has already begun synapsis, the location of the constriction in the dumb-bell shaped body still serving to underline the size difference of the two bodies (Photo 18). The situation illustrated in Photo 20 (Fig. 25) appears to be the sequel to what is found in Photo 18. The Feulgen positive elements have already resolved themselves into a nucleus in the mother cell, while in the bud one pair of unequal chromosomes are synapsing, the other pair still maintaining discreteness. Even here the difference in the size of the synapsing chromosomes is quite apparent.

The configuration of the chromatin elements in the mother cell in Photo 19 (Fig. 26) could be derived from the disposition and relative sizes of the chromosomes in the two groups observed in the cell illustrated by Photo 17 (Fig. 23). With the end of anaphase the chromosomes oftens well slightly. In the case of the top yeast which has unequal chromosomes, this leads to a loss of the size differences so that they become indistinguishable. Usually such a process precedes the onset of synapsis in telophase. It is therefore concluded that the group of equally sized chromosomes lying towards the base of the cell is on the road to synapsis. Completion of synapsis would next lead to the presence of four chromosomes towards the upper part of the cell, the lower region containing a single reconstituted nucleus. This is what is seen in the mother cell in Photo 19. The reconstituted nucleus would most probably move into the bud. The four chromosomes at the base of the mother cell, which already appear to have lost their size differences would provide the nucleus after synapsis.

Photo 21 (Fig. 27) is illustrative of a situation in tetraploid division which is analogous to what is known in the diploid (cf. *N* in Photo 15). While the mother cell has gone completely into the resting condition, the bud still shows four discrete chromosomes. Apparently movement of these bodies commenced very late with the result that by the time

the bud received them, the chromosome complement of the mother cell had completed the telophase. Photomicrographs 17—21 would therefore offer sufficient justification for the claim that periodically a few tetraploids spontaneously originate in a purely diploid culture and that these tetraploids show the same characteristic features during mitosis as the diploids.

Discussion.

From the observations recorded in this paper, it would be apparent that the fundamental premise on the basis of which this investigation was undertaken, has found ample justification. Being a purely aerobic organism capable of utilising the maltose in the wort only for purposes of growth, the yeast strain BY 2, has enabled a study of its cytology under relatively easy conditions of handling without any complicating pictures. It is interesting to note that like the control diploid, this mutant top yeast also has shown remarkable stability in its chromosome constitution for the past seven years (SUBRAMANIAM and RANGANATHAN, 1946; ROYAN and SUBRAMANIAM, 1951).

The effect of different methods of fixation and staining on the morphology of the chromosomes in yeast has already been discussed (SUBRAMANIAM, 1951; DURAISWAMI, 1953). The chromosomes which appear slightly rod-shaped when fixed in Carnoy and stained with haematoxylin (SUBRAMANIAM, 1946; RANGANATHAN and SUBRAMANIAM, 1948), assume a spherical shape on staining by the Feulgen technique after fixation in OsO_4 vapour. Use of the latter fixative however, produces the least distortion. Whatever the minor alterations effected by the fixatives, they do not influence the characteristic movement of the chromosomes in mitosis.

That there is a basic pattern of behaviour of the chromosomes of yeasts during mitosis would be apparent on a comparison of the photomicrographs with those already presented by DURAISWAMI (1953). A positive Feulgen reaction in the nucleus is elicited only when it changes from the resting condition and starts on the mitotic cycle. The ultimate size attained by the chromatin grain in prophase is virtually identical with that of the Feulgen positive mass of the reconstituted nucleus at telophase. The apparent division of this chromatin mass into a dumb-bell shaped body constitutes the mid prophase. Though the initial constriction effects only a separation into two bodies of equal size, the fact that there is a marked difference in size of the resultant pro-metaphase chromosomes suggests that there is a differential contraction of the two chromosomes during late prophase. It is of course well known that in higher organisms "the contraction of the chromosomes reaches its maximum at the last stages of prophase" (DARLINGTON, 1937, p. 25).

During metaphase the chromosomes are seen to reproduce themselves leading to the formation of replicas (Photos 5 and 6; Figs. 8 and 9).

The repulsion between the two groups of daughter chromosomes and the consequent movement of the complements to the poles denotes the anaphase. In yeast possessing an identical pair of chromosomes it is easy to demonstrate that each produces its replica, but difficult to offer convincing proof that the complement passing on to the bud is constituted by the products of division of each one of the two daughter chromosomes, such that mother cell and bud have the identical chromosome make up at the end of the cycle. It is in this context, that a study of the mitotic behaviour of the top yeast, BY 2, possessing as it does a pair of unequal chromosomes, assumes great significance. This material is ideally suited for a demonstration that each of the chromosomes divides once and that the mother cell and bud do *not* differ in regard to their chromosomal complements which are identical, because it is possible to show that after anaphase the mother cell and the bud get only an unequal pair of chromosomes each.

The reconstitution of the nucleus in telophase is by an exact reversal of the stages leading to the metaphase. The formation of a single chromatin mass during this stage could be attributed to two factors viz. somatic pairing followed by somatic synapsis. Evidence for the possible existence of somatic synapsis have already been presented and discussed by other workers from this laboratory (RANGANATHAN and SUBRAMANIAM, 1948; DURAISWAMI, 1953). The photomicrographs accompanying this paper provide sufficient critical proof for the occurrence of somatic synapsis. A perusal of Photos 8, 9, 13 and 16 would show how during telophase the two unequal chromosomes undergoing active somatic pairing at the end of anaphase, synapse to give rise to the characteristic single chromatin mass of the reconstituted nucleus. All that occurs in the succeeding prophase therefore, is merely the separation of the two unequal chromosomes from the synapsed mass of chromatin. This explains the peculiar configuration seen in cells in early prophase, which apparently resembles a process of division. The appearance of a constriction and the later separation of the chromosomes to constitute the characteristic pro-metaphase indicate therefore, a loss of the synaptic force followed by loss of active pairing. Somatic pairing is resumed once more only after the first movements in anaphase are over. During telophase of course the chromosomes once again undergo active synapsis leading to the formation of a characteristic nucleus (Photo 11; *K* in Photo 12; Figs. 15 and 16) composed of a chromophobic interior, a chromophilic cortex and a hyaline area on the outside. The last mentioned completely delimits the nucleus from the cytoplasm.

From what has been detailed above, it would be apparent that though the top yeast shows all the main features of mitosis described in the case of higher organisms, there are certain important deviations from

the conventional process. These departures have been interpreted as due to the existence in yeasts during normal mitosis of the phenomena of somatic pairing and somatic synapsis. The evidence available for such a postulate has been derived from a number of different strains worked out in this laboratory (SUBRAMANIAM, 1946; RANGANATHAN and SUBRAMANIAM, 1948; DURAI SWAMI, 1953). The curious fact is that even the rarely occurring spontaneous tetraploids illustrated in this paper

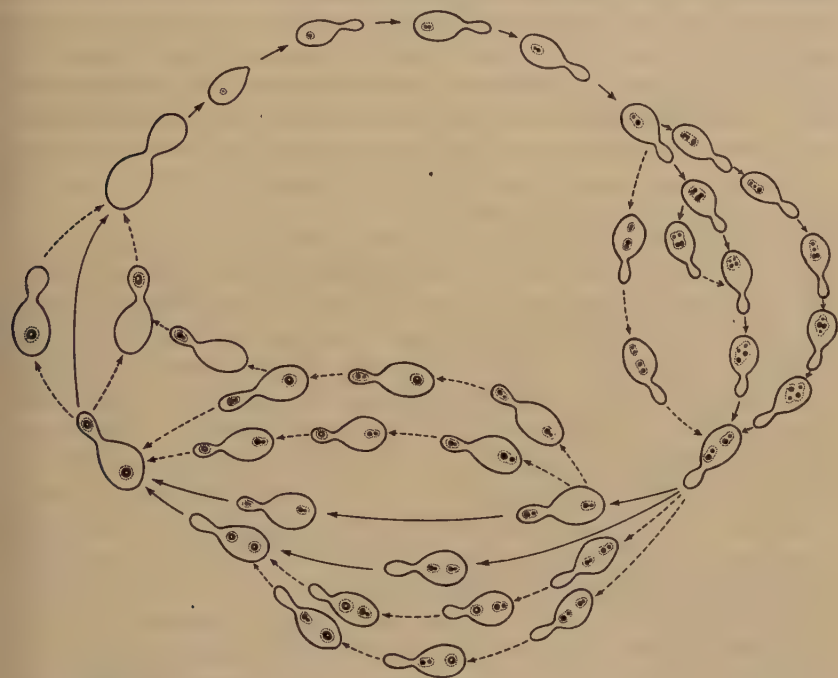


Fig. 28. Pictographic summary of mitosis in the riboflavin excreting Top Yeast Mutant.

exhibit these phenomena. It is therefore apparent that there is considerable justification for the belief that somatic pairing and synapsis are of common occurrence in yeasts.

The occurrence of spontaneous tetraploid cells (Photos 17—21; Figs. 23—27) in the culture of BY 2, a diploid, confirms earlier observations of a similar nature from this laboratory. In view of the rarity of this spontaneous doubling of the chromosome number, it has not been possible till now to obtain cells in a connected series of stages, nor were critical pictures of an early anaphase available. Photo 20 (Fig. 25) is a stage comparable to that recorded by DURAI SWAMI (Photo 29; 1953) and illustrates the "post-anaphase" condition of the tetraploid. The four

chromosomes of the mother cell have already reconstituted a nucleus. Those in the bud are still discrete. Of these two are synapsing, indicating that the forces responsible for the telophasic changes have commenced operating. Comparison of the nuclei formed in the diploid and the tetraploid cells shows no difference in their sizes. This is contrary to the general belief that the size of a nucleus bears a relation to its chromosome number. However even among higher organisms there are many well-known exceptions. DARLINGTON (1937) remarks: "Special genetic conditions may affect the relation of the bulk of the chromosomes to that of the nucleus, for in the male bee with half the number of chromosomes of the female, the nuclei are of similar size in corresponding cells" (p. 20). The basis for an assessment of the difference in nuclear size is measurements made on resting nuclei. In yeast, staining the resting nuclei is very difficult and nuclei in the telophase are unsuitable for such measurements in view of their short life.

Investigations in this laboratory on the effect of polyploidogens on the control diploid yeast, led to the formulation of the view that inhibition of cell division was but one of the factors necessary for the production of races with doubled chromosomal complements. Treatments with these agencies had to be carried out continuously for periods ranging from 30 to 90 days, before stable autotetraploid types could be obtained. It appeared therefore that the important factor was the ability of the doubled complement of chromosomes to function harmoniously and it was postulated that mutation at a locus governing 'ploidy' should precede a doubling of the chromosome number. The rarity of the phenomenon of somatic chromosomal doubling leading to stable tetraploid types showing mitotic phenomena characteristic of a yeast with four chromosomes (Photos 17—21) further justify the above conclusions.

The fact that spontaneous but stable tetraploids occur, though rarely, in diploid cultures of yeast has great significance in genetic investigations on this organism. As has already been pointed out on a number of occasions (SUBRAMANIAM, 1950a, b, c; 1952) investigators on the genetics of yeasts do not have valid criteria for distinguishing haploids from diploids and both from tetraploids. Any spontaneously occurring tetraploid clone in a diploid culture would therefore have been missed by these investigators. The curious segregations reported in the past by a number of workers (WINGE and LAUSTSEN, 1940; WINGE, 1944; LINDEGREN, 1945c; SPIEGELMAN, 1946) and attributed by them to the presence of cytoplasmic factors and the like, may very well have been the result of mistaking a culture containing a mixture of diploid and tetraploid types for a purely diploid clone. Recently, however, many workers have taken into consideration the above possibilities (FOWELL, 1951; ROMAN, HAWTHORNE and DOUGLAS, 1951; LINDEGREN and LINDEGREN,

1951). The recent claim of POMPER (1952) on the isolation of triploid *Saccharomyces* is under the circumstances not surprising at all.

The various strains of yeasts investigated in this laboratory for cytological behaviour have not shown any close correlation between mitosis and cytokinesis. In the control, BY 1, DURAISWAMI (1953) observed that bud formation occurred only after the metaphase was over. The strain BY 2, however shows a difference. A perusal of the photomicrographs illustrating this paper would indicate that the bud may arise at any stage in the mitotic cycle. Even as early as pro-metaphase, some cells have a big bud as in cell *G* in Photo 3. As already postulated (DURAISWAMI, 1953) the lack of synchronisation between nuclear and cytoplasmic division in yeast may be due to the peculiar mode of vegetative propagation of this organism.

Summary.

1. Unorthodox methods of approach appear to be responsible for the radical divergences in views regarding the identification of the various organelles in a budding yeast cell.

2. The problems of yeast cytology are analysed, and the necessity to distinguish the cytological behaviour of an aerobically growing culture from an anaerobic one is emphasized.

3. Photomicrographic proof for mitosis is offered in a purely aerobic strain of yeast having a pair of unequal chromosomes.

4. The chromatin mass seen at early prophase resolves itself into the pair of unequal metaphase chromosomes. These reproduce and the mother cell and bud regularly receive an unequal pair.

5. Evidence for somatic pairing and synapsis is presented. The reconstitution of the nucleus in the telophase takes place by an exact reversal of the stages leading to the metaphase thus proving chromosome continuity.

6. The cytological behaviour of the rare spontaneous autotetraploids arising in normal diploid cultures is illustrated and their significance in genetic investigations discussed.

7. A pictographic summary of the mitotic cycle is given.

Acknowledgment.

The author's grateful thanks are due to Dr. M. K. SUBRAMANIAM for constant guidance and active encouragement during the course of this investigation. The generous financial assistance of the Council of Scientific and Industrial Research, India, is gratefully acknowledged.

References.

BADIAN, J.: Bull. Internat. Acad. Polonaise, B 1, 61 (1937). — BRETSCHNEIDER, L. H.: Internat. Rev. Cytology 1, Academic Press Inc. New York, 1952. — DARLINGTON, C. D.: Recent Advances in Cytology. London, J. & A. Churchill 1937. —

- DARLINGTON, C. D., and L. F. LA COUR: *The Handling of Chromosomes*. London, Allen and Unwin Ltd 1950. — DURAISWAMI, S.: *Cellule* **55**, 381 (1953). — DURAISWAMI, S., and M. K. SUBRAMANIAM: *Experientia* **7**, 422 (1951). — FOWELL, R. R.: *J. Inst. Brewing*, **48** (N. S.), 180 (1951). — FUHRMANN, F.: *Centralbl. f. Bakt.* II. Abt. **15**, 769 (1906). — GUILLIERMOND, A.: *The Yeasts*. New York, (1920). — HUSKINS, C. L.: *Internat. Rev. Cytology*, **1**, Academic Press Inc. New York, (1952). — KAPLAN, R. W.: *Ann. Rev. Microbiol.* **6**, 49 (1952). — LIETZ, K.: *Arch. f. Mikrobiol.* **16**, 275 (1951). — LEVAN, A.: *Hereditas* **33**, 457 (1947). — LINDEGREN, C. C.: *Mycologia* **37**, 767 (1945a); *Bact. Rev.* **9**, 111 (1945b); *Ann. Mo. Bot. Gdn.* **32**, 107 (1945c); *The Yeast Cell. Its Genetics and Cytology*. Educational Publishers Inc. St. Louis, Mo. (1949); *Expl. Cell Res.* **2**, 305 (1951); *Symp. Soc. Expl. Biol.* **6**, 277 (1952). — LINDEGREN, C. C., and G. LINDEGREN: *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **11**, 115 (1946); *J. Gen. Microbiol.* **5**, 885 (1951). — LINDEGREN, C. C., and M. M. RAFALCO: *Expl. Cell Res.* **1**, 169 (1950). — MITRA, K. K.: *J. Sci. Ind. Res.* **8 B**, 236 (1949); *Proc. Ind. Sci. Cong.*, Poona (1950); *J. Sci. Ind. Res.* **11 B**, 109 (1952a); *Biochim. et Biophys. Acta* **8**, 615 (1952b). — MITRA, K. K., and M. K. SUBRAMANIAM: *J. Ind. Inst. Sci.* **32 A**, 113 (1950). — NAGEL, L.: *Ann. Mo. Bot. Gdn.* **33**, 249 (1946). — POMPER, S.: *Nature* **170**, 892 (1952). — PRAHLAD RAO, L. S., and M. K. SUBRAMANIAM: *Arch. f. Mikrobiol.* **17** 160 (1952); *Proc. Ind. Acad. Sci.* **37 B**, 72 (1953). — PREMA BAI, M.: *Curr. Sci.* **16**, 316 (1947). — PUNKARI, L., and A. T. HENRICI: *J. Bact.* **26**, 125 (1933). — RANGANATHAN, B.: *J. Ind. Inst. Sci.* **32 A**, 91 (1950). — RANGANATHAN, B., and M. K. SUBRAMANIAM: *Sci. and Cult.* **12**, 478 (1947); *Proc. Nat. Inst. Sci. (India)* **14**, 389 (1948); *J. Ind. Inst. Sci.* **32 A**, 51 (1950); *Ibid.* **34**, 235 (1952). — ROBINOW, C. F.: *Microbial Genetics*. 1951, 172. Wisconsin: Ed. J. Lederberg. — ROMAN, H., D. C. HAWTHORNE and H. C. DOUGLAS: *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S.* **37**, 79 (1951). — ROYAN, S., and M. K. SUBRAMANIAM: *Curr. Sci.* **20**, 161 (1951); *Nature* **169**, 932 (1952). — SCHRADER, F.: *Mitosis*. New York, 1946. — SHARP, L. W.: *Introduction to Cytology*. New York, McGraw Hill Book Co. 1934. — SPIEGELMAN, S.: *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **11**, 256 (1946). — SUBRAMANIAM, M. K.: *Curr. Sci.* **14**, 234 (1945); *Proc. Nat. Inst. Sci. India* **12**, 143 (1946); *Ibid.* **13**, 129 (1947a); *Curr. Sci.* **16**, 157 (1947b); *Proc. Nat. Inst. Sci. India* **14**, 315 (1948a); *Ibid.* **14**, 325 (1948b); *J. Ind. Inst. Sci.* **32 A**, 29 (1950a); *Ibid.* **32 A**, 41 (1950b); **32 A**, 73 (1950c); **34**, 11 (1952); *Cellule* **54**, 145 (1951). — SUBRAMANIAM, M. K., and S. N. KRISHNA MURTHY: *Proc. Ind. Acad. Sci., B* **30**, 185 (1949). — SUBRAMANIAM, M. K., and B. RANGANATHAN: *Curr. Sci.* **14**, 78 (1945a); *Ibid.* **14**, 131 (1945b); *Nature* **157**, 49 (1946). — SUBRAMANIAM, M. K., and S. K. SREEPATHI RAO: *Proc. Ind. Acad. Sci., B* **35**, 1 (1952). — WHITE, M. J. D.: *Cytology and Cell Physiology*. Oxford: Ed. G. H. Bourne, 2nd. Edn., 1951. — WILSON, E. B.: *The Cell in Development and Heredity*. London, 1904. — WINGE, O.: *C. R. Lab. Carlsberg. Ser. Physiol.* **24**, 79 (1944); *Ibid.* **25**, 85 (1951a); *Curr. Sci.* **20**, 236 (1951b). — WINGE, O., and O. LAUSTSEN: *C. R. Lab. Carlsberg. Ser. Physiol.* **23**, 17 (1940).

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen.)

Über den Einfluß photoperiodischer Behandlung auf die Befallsintensität beim Gerstenmehltau*.

Von
KLAUS HEINZ DOMSCH.

Mit 34 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. Mai 1953.)

In den drei Jahrzehnten, die seit den grundlegenden photoperiodischen Experimenten von GARNER und ALLARD (1920) vergangen sind, wurde schon mehrfach der Versuch gemacht, die Zusammenhänge zwischen der Tageslänge und dem Auftreten von Pflanzenkrankheiten aufzudecken. Man kann die „Tageslänge“ dabei in dreifacher Weise auf die Versuchspflanzen wirken lassen, nämlich a) vor und nach dem Impfen mit dem Krankheitserreger, b) nur vor dem Impfen und c) nur nach dem Impfen.

Tabelle 1. Höhe des Befalls bei photoperiodischer Behandlung vor und nach dem Impfen.
KT = Kurztag, LT = Langtag.

Parasit	Wirt	Tageslänge bei		Autor
		hohem Befall	geringem Befall	
<i>Cronartium ribicola</i>	<i>Ribes nigrum</i>	mittl. Tagesl.	KT, LT	MOSHKOV (1938)
<i>Erysiphe graminis</i>	<i>Triticum vulgare</i> , <i>Avena sativa</i>	KT	LT	GRAINGER (1947)
<i>Erysiphe graminis</i>	<i>Triticum vulgare</i>	mittl. Tagesl.	KT, LT	CHEREWICK (1944)
<i>Puccinia graminis</i>	<i>Triticum vulgare</i>	KT	LT	JOHNSON und NEWTON (1940)
<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Solanum lycop.</i>	KT	LT	VOLK (1931)
<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	KT	LT	GRECHUSHENIKOV (1939)
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	KT	LT	GALLEGLY und WALKER (1949)

In Tab. 1 sind aus der Literatur Versuche zusammengestellt, die in ihrer Anlage der Gruppe a) entsprechen. Obwohl die zitierten Arbeiten mit sehr unterschiedlicher Methodik und an den verschiedensten Objekten durchgeführt worden sind, läßt sich doch eine einheitliche Tendenz herauslesen. Die Parasiten verhalten sich offenbar alle ähnlich, und die größte Anfälligkeit findet sich nicht unter Langtagbedingungen.

* Dissertation der Math.-Naturw. Fakultät der Universität Göttingen, 1953.

Bei photoperiodischer Behandlung vor dem Impfen (b) können vom Zeitpunkt des Impfens an nur die durch die Vorbehandlung in der Wirtspflanze festgelegten Bedingungen das Ausmaß des Befalls bestimmen. Bei entsprechenden Versuchen (FOSTER und WALKER 1947, GALLEGLY und WALKER 1949) mit *Solanum lycopersicum* und *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* bzw. *Pseudomonas solanacearum* war der Krankheitsindex im Kurztag höher als im Langtag. Zu negativen Resultaten sind dagegen GASSNER und APPEL (1927) mit *Puccinia coronifera* auf Hafer gekommen; sie meinen, daß die Wirtspflanzen den Ernährungszustand sehr schnell wieder ausgleichen und daher nicht in besonderer Weise prädisponiert seien.

Einige Arbeiten liegen auch über den Einfluß der Tageslänge auf beimpfte Pflanzen vor (c). Bei den folgenden Wirt/Parasit-Paaren *Hordeum sativum*/*Puccinia glumarum* (BEVER 1934), *Triticum vulgare*/*Erysiphe graminis* (PRATT 1944) und *Avena sativa*/*Puccinia coronifera* (GASSNER und APPEL 1927) war die Inkubationszeit um so länger, je kürzer die Dauer der täglichen Belichtung war. CHEREWICK (1944) fand dagegen völlige Wirkungslosigkeit photoperiodischer Behandlung nach dem Impfen beim Getreidemehltau, während YARWOOD (1936) zeigen konnte, daß *Erysiphe polygoni* auf *Trifolium* die meisten Appressorien in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12:12¹ Std bildet (mit Abnahme gegen den kürzeren und längeren Tag), und daß die Appressorien nur im Licht gebildet werden. Weitere Versuche liegen von HASSEBRAUK (1940) mit Rostpilzen vor: Verkürzung der Tageslänge führte je nach der Wirt-Parasit-Kombination zu verschiedenen Infektionstypen; aus diesen Versuchen wird besonders deutlich, daß sich sowohl physiologische Rassen der Rostpilze als auch Getreidesorten nicht einheitlich verhalten.

Schließlich sind an dieser Stelle einige Versuche anzuführen, die auf Grund der angewandten Impfmethode (Saatgutinfektion) eine Sonderstellung einnehmen. Untersuchungen mit *Tilletia levis* und *T. tritici* (RODENHISER und TAYLOR 1940, 1943), mit *Urocystis occulta* (LING 1941) und *Ustilago avenae* (POHJAKALLIO 1952) zeigten überwiegend stärkeren Befall im Langtag; dagegen kam REED (1938) bei Kombination von 9 Hafersorten mit 4 Brandrassen zu keinen übereinstimmenden Ergebnissen. Russische Arbeiten berichten über den Befall von *Helianthus annuus* durch *Orobanche cumana* und *Monotropa hypopitys* (ZAKHAROV 1940, 1941) und von *Cannabis sativus* durch *Orobanche ramosa* (CAJLACHJAN 1947); in den ersten beiden Fällen gab es hohen Befall im Kurztag, im zweiten Falle im Langtag.

Die nachstehenden Versuche sollen unter besonderer Berücksichtigung der Prädisposition der Wirtspflanze dazu beitragen, die Zusammenhänge zwischen Photoperiode und pilzlichem Parasitismus weiter zu klären.

I. Die Versuche.

A. Material und Methoden.

1. Versuchsobjekte.

a) Die Wirtspflanze.

Für die Untersuchungen kamen nur Lang- oder Kurztagpflanzen mit einer raschen, von Anfang an photoperiodisch empfindlichen Entwicklungszeit in Betracht. Diesen Forderungen genügen gewisse Sommer-

¹ Bei allen nachfolgenden Angaben über den Licht-Dunkel-Rhythmus sind die Dunkelstunden unterstrichen.

getreidesorten recht gut. Für die Versuche wurde *Hordeum sativum*, Sorte „Morgenrot“ verwendet¹.

b) Der Parasit.

Beim Krankheitserreger müssen Spezialisierung, kurze Inkubations- und Fruktifikationszeit und eindeutige Krankheitssymptome, die auf einfachem Wege quantitativ erfaßbar sein sollen, vorausgesetzt werden. Da durch die Wirtspflanze die Zahl der in Frage kommenden Erreger bereits eingeschränkt ist, fiel die Wahl auf *Erysiphe graminis hordei* Marchal. Da „Morgenrot“ nach den bisherigen Erfahrungen nicht die Eigenschaft hat, physiologische Rassen des Mehltaus aufzuspalten, wurde auf Bestimmung der Rasse verzichtet.

2. Versuchsanordnung.

a) Photoperiodische Behandlung.

Nach v. DENFFER (1939) liegt die günstigste Zeit für die photoperiodische Induktion der Gerste in der 2.—3. Woche nach dem Auflaufen. Mit der Behandlung wurde deshalb entweder sofort oder 5 oder 10 Tage nach dem Auflaufen der Saat begonnen. Kurze Tageslängen wurden durch Verdunkeln der Pflanzen mit lichtdichten Kästen erhalten, Tageslängen, die die Dauer des natürlichen Tages überschritten, durch Verlängerung des Tageslichtes mit 200 Watt-Birnen im Abstand von 60 cm über den Pflanzen. Die Intensitätsschwankungen zwischen Zusatz- und natürlichem Licht konnten vernachlässigt werden, da Langtagpflanzen schon durch ganz geringe Intensitäten induziert werden können (HARDER, FABIAN und v. DENFFER 1937). Der Lichtbeginn lag in jedem Falle morgens um 8 Uhr.

Die Pflanzen wurden mit folgenden Licht/Dunkel-Rhythmen behandelt:

- 2:22 = 2 Licht- und 22 Dunkelstunden = KT,
- 7:17 = 7 Licht- und 17 Dunkelstunden = KT,
- 12:12 = 12 Licht- und 12 Dunkelstunden = „Normaltag“,
- 17:7 = 17 Licht- und 7 Dunkelstunden = LT,
- 22:2 = 22 Licht- und 2 Dunkelstunden = LT.

b) Anzucht der Versuchspflanzen.

Je Photoperiode wurden in 8—9 Töpfen (8 cm Ø, Komposterde) je 10 Samen ausgelegt, von denen etwa 60—70 gleichmäßig gewachsene Pflanzen in den Versuch kamen. Pflanzen mit abnormaler Keimlingsentwicklung wurden ausgeschieden. Unter extremen Kurztagbedingungen war die Zahl der bei der Auswertung noch vorhandenen Pflanzen niedriger, da wegen der Brüchigkeit der Blätter beim Impfen einige Pflanzen ausfielen.

c) Temperatur und Luftfeuchtigkeit.

Alle Versuche über den Einfluß der Photoperiode wurden im Gewächshaus durchgeführt. In den Wintermonaten (November bis Februar) und im Hochsommer (Juli, August) wurden diese Versuche ausgesetzt. Aus technischen Gründen mußten

¹ „Morgenrot“ ist aus der Kreuzung „Heils Franken“ × „Australische Frühe“ hervorgegangen und enthält keine Mehltaresistenzfaktoren (nach freundlicher Mitteilung von Fräulein Dr. G. ZIEGENBEIN). Das Saatgut wurde von der „Nordsaat“ Saatzuchtgesellschaft bezogen.

Schwankungen der Temperatur von Tag zu Tag und im Tagesverlauf in Kauf genommen werden. Alle Pflanzen eines Versuches standen aber in sich unter gleichen Temperaturen. Die durchschnittlichen Tagestemperaturen schwankten maximal um $\pm 2^\circ$, wodurch der Befall nicht meßbar beeinflusst werden kann (siehe PRATT 1943). Letzteres gilt auch für die relative Luftfeuchtigkeit, deren Schwankungen im Mittel bei $\pm 10\%$ lagen. Um bei langen Verdunklungszeiten beimpfter Pflanzen eine ungleiche Zunahme der Luftfeuchtigkeit zu vermeiden, wurden alle Versuchspflanzen der Gruppen „N“ und „VN“ (siehe unten) nach dem Impfen unter Cellophankästen gestellt, die wie oben verdunkelt werden konnten.

d) Impfmethode.

Zur Sporengewinnung wurden im „Normaltag“ aufgezogene Pflanzen verwendet, auf die der im Bot. Garten isolierte Pilz wöchentlich übergeimpft wurde. Die Conidien wurden in Wasser aufgenommen und in der Zählkammer (nach THOMA) aus-

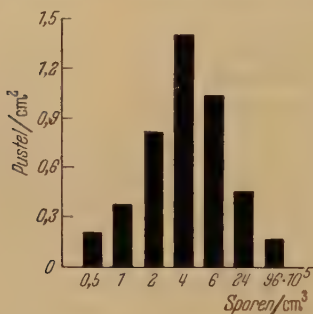


Abb. 1. Pustelzahl bei Impfung mit Sporensuspensionen verschiedener Konzentration. Alle Differenzen sind mit $P < 0,0027$ gesichert.

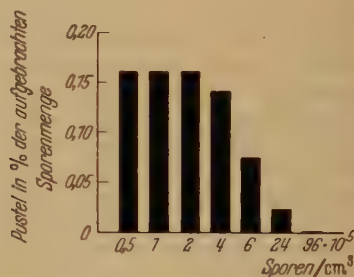


Abb. 2. Zu Pusteln entwickelte Sporen in Prozent der aufgebrauchten Sporenmenge.

gezählt. Anschließend wurde die Sporensuspension auf eine durch Vorversuche ermittelte Konzentration gebracht (rund $2,5 \cdot 10^5$ Sporen/cm³). Wie stark die Pustelzahl von der Sporendichte in der Suspension abhängig ist, kann aus dem in Abb. 1 dargestellten Versuch ersehen werden.

Auf 1 cm² Blattfläche kommen im Mittel 2,5 mm³ Sporensuspension. Bei einer durchschnittlichen Konzentration von $2,5 \cdot 10^5$ Sporen/cm³ errechnen sich rund 6–700 Sporen, die auf 1 cm² Blattfläche aufgebracht werden. Der Prozentsatz an tatsächlich auszählbaren Pusteln ist je Blattflächeneinheit aber um ein Vielfaches geringer. Es ist auffällig, daß bis zu einem gewissen Schwellenwert unabhängig von der Konzentration der Suspension etwa 0,16% der aufgebrauchten Sporen als Pusteln auszählbar sind, und daß bei einer Verstärkung der Suspension über $2,5 \cdot 10^5$ der Prozentsatz stark absinkt (Abb. 2).

Beimpft wurde nur das Primärblatt an der Ober- und Unterseite, und zwar mit einem Wattepinzel; die wäßrige Suspension wurde nicht aufgesprüht, weil dabei die gleichmäßige Benetzung der Blätter nicht sicher ist. Da das Impfen eines Versuches (300–400 Pflanzen) 1½–2 Std in Anspruch nahm, wurde dafür gesorgt, daß zu gleichen Zeiten auf Pflanzen aus allen Gruppen Sporen aufgetragen wurden. Das war unerlässlich notwendig, denn der Wirkungsgrad der Sporensuspension nahm im Laufe der Zeit ab (Abb. 3); schon rund ½ Std nach Ansetzen der Sporenaufschwemmung war der Infektionserfolg um etwa ⅓ vermindert! Die sich hieraus ergebenden Schwierigkeiten wurden in einem Kontrollversuch (siehe unter 3) näher untersucht.

e) Auswertung.

Der Krankheitsbefall wird nachstehend in „Infektionsstellen je Blattflächeneinheit“ angegeben. Hierzu wurde an jedem Blatt die Anzahl der Pusteln an der Ober- und Unterseite zusammengezählt und zugleich die Länge und Breite jedes Blattes gemessen; durch Multiplikation der Längen- und Breitenwerte erhält man einen Näherungswert für die Blattfläche, auf den die Gesamtzahl der Pusteln bezogen wurde (Pustel/cm²). Da bei Wiederholung von Versuchen nur annähernd gleiche Absolutwerte erhalten werden konnten, wurde in jedem Versuch der Befall im „Normaltag“ (12:12) = 100 gesetzt. Die Befallswerte der anderen Gruppen wurden darauf bezogen.

Der Grund für die Abweichungen der Absolutwerte liegt sehr wahrscheinlich darin, daß die in der Kette abgeschnürten Conidien nur während einer kurzen Zeit die gleichen parasitischen Eigen-

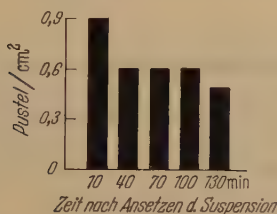


Abb. 3. Einfluß des Alters einer Sporensuspension (in Minuten nach Ansetzen der Suspension) auf den Infektionserfolg. Nur die erste Differenz ist mit $P = 0,001$ gesichert.

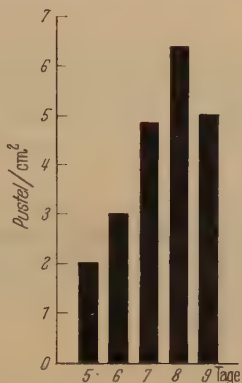


Abb. 4. Einfluß des „Reifegrades“ der Sporen (Tage nach dem Impfen) auf den Wirkungsgrad einer Sporensuspension.

P-Werte: < 0,0027; < 0,0027; 0,005; 0,01¹.

schaften besitzen. Einen Einblick in die Verhältnisse bekommt man aus dem in Abb. 4 dargestellten Versuch: Erst 8 Tage nach dem Impfen hat der Pilz Sporen mit voller Infektionstüchtigkeit gebildet, obwohl die Fruktifikationszeit nur 5 Tage lang ist. Zu Beginn der Versuche konnte aber das Sporenalter nicht völlig konstant gehalten werden.

f) Statistische Bearbeitung.

Zur Berechnung des statistischen Mittelwertes

$$M = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

aus den 60—80 Einzelmessungen je Photoperiode wurde das Multiplikationsverfahren (WEBER 1948) angewandt. Nach Ermittlung der Standardabweichung (oder Streuung)

$$\sigma_m = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n z_i (x_i - M)^2}{n - 1}},$$

die ein Maß für die Variabilität der Meßwerte ist, wurde die mittlere Abweichung des Mittelwertes (S_m) errechnet. S_m ist mit σ_m durch die Gleichung

$$S_m = \frac{\sigma_m}{\sqrt{n}}$$

¹ Die P-Werte stehen im folgenden in der Reihenfolge der zu sichernden Differenzen (soweit nicht anders angegeben). In diesem Beispiel waren die Differenzen 6—5, 7—6, 8—7, 9—8 (Tage) zu sichern.

verbunden. Für die Beurteilung der Ergebnisse ist es wichtig zu wissen, ob zwischen zwei Werten M_x und M_y ein gesicherter Unterschied besteht. Der mittlere Fehler der Differenz $S_x - S_y$ ist gegeben durch die Gleichung

$$S_D = \sqrt{S_x^2 + S_y^2}$$

(nach KOLLER 1943), sofern die Differenz selbst nicht zu groß wird. Da die Forderung des dreifachen mittleren Fehlers nur für Meßreihen mit sehr hoher Gliederzahl gilt, ist nach einem von PÄTAU (1943) vorgeschlagenen Verfahren mit Hilfe des t -Wertes

$$t_m = \frac{M_x - M_y}{S_D}$$

das zu t_m gehörige P aus einer gegebenen Tafel zu ermitteln (PÄTAU 1943). Zur weiteren Festigung wurden nahezu alle Versuche wiederholt. Korrespondierende P -Werte aus einzelnen, unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchen wurden mit Hilfe der χ^2 -Methode zu einem Gesamt- P zusammengefaßt. $P \leq 0,01$ wurde als schwache, $P \leq 0,0027$ als gute Sicherung für eine Differenz angesehen.

3. Kontrollversuch.

Um zu prüfen, ob unter gleichen Versuchsbedingungen übereinstimmende Mittelwerte für die Befallsintensität gefunden werden, wurde ein Kontrollversuch mit 3

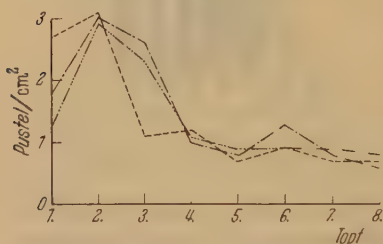


Abb. 5. Höhe der Befallsintensität im Verlauf einer Impfung in drei verschiedenen Gruppen zu je 8 Töpfen.

unter sich völlig gleichen Gruppen angesetzt. Die 8 Töpfe jeder Gruppe wurden in der oben beschriebenen Weise beimpft. Der Versuch ergab den schon in Abb. 3 dargestellten Befund, daß die Befallsintensität vom ersten (bzw. zweiten) gegen den zuletzt beimpften Topf abnimmt (Abb. 5). Auch hier erfolgte der Abfall zunächst steil und klang gegen Ende flach aus. Die Mittelwerte der drei Gruppen stimmten mit $1,40 \pm 0,16$, $1,52 \pm 0,18$ und $1,40 \pm 0,15$ aber trotzdem recht gut überein. Wurden die Pusteln nur aus den Töpfen 4—8 berechnet, so ergaben

sich keine besseren Werte. Weitere, in gleicher Weise angestellte Kontrollversuche bestätigten die Brauchbarkeit der Methode.

B. Ergebnisse.

Entsprechend der immer wieder erhobenen Forderung, phytopathologische Probleme in ihrer Dreiteiligkeit: Kranke Pflanze, Krankheitserreger, Gesunde Pflanze, zu sehen, soll auch im folgenden vorgefahren werden. Dabei nimmt naturgemäß die Behandlung des Komplexes „Kranke Pflanze“ mehr Raum ein, da sich *Erysiphe graminis* als obligat biotropher Parasit einer gesonderten, direkten Untersuchung entzieht.

1. Untersuchungen über den Komplex: Kranke Pflanze.

Das in der Einleitung aufgestellte Einteilungsprinzip gab auch den Rahmen für die folgenden Versuche.

a) Photoperiodische Behandlung vor und nach dem Impfen.

Zur Orientierung über die Versuchsanordnung möge die Abb. 6 dienen. Sie zeigt, daß mit der photoperiodischen Behandlung der Pflanzen sofort nach dem Auflaufen begonnen wurde. Nach dem Beimpfen wurden die Pflanzen unter den gleichen Bedingungen weitergezogen. Die 4 Versuche tragen die Bezeichnung „VN“ („vor-nach“) und unterscheiden sich voneinander durch die Zahl der Tage bis zum Impfen (5—15 Tage). Die Auswertung erfolgte hier wie bei allen folgenden Versuchen stets 8 Tage nach dem Impfen.

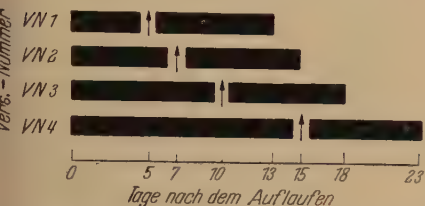


Abb. 6. Schema der Versuche bei photoperiodischer Behandlung vor und nach dem Impfen. Dunkles Feld: Dauer der photoperiodischen Behandlung in Tagen nach dem Auflaufen der Keimlinge. ↑ Zeitpunkt der Impfung (also 5, 7, 10 oder 15 Tage nach dem Auflaufen). Die obere Reihe bedeutet also, daß die Pflanzen 13 Tage photoperiodisch behandelt und am 5. Tage nach dem Auflaufen beimpft wurden.

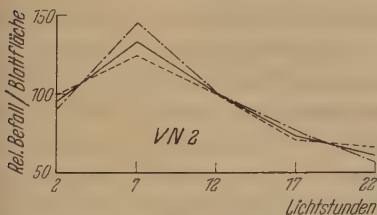


Abb. 8. Wie Abb. 7. Alter der Pflanzen beim Impfen 7 Tage (VN 2). P-Werte: $< 0,0027$; $< 0,0027$; $< 0,0027$; 0,03.

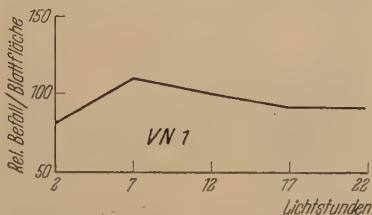


Abb. 7. Befallsintensität bei verschiedener Dauer der täglichen Belichtung. Alter der Pflanzen beim Impfen 5 Tage, photoperiodische Behandlung vor und nach dem Impfen (VN 1). Nur die erste Differenz ist schwach ($P = 0,009$) gesichert.

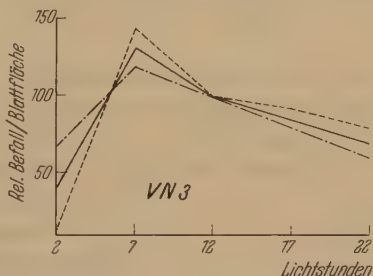


Abb. 9. Wie Abb. 7. Alter der Pflanzen beim Impfen 10 Tage (VN 3). P-Werte: $< 0,0027$; $< 0,0027$; 0,1; $< 0,0027$.

Waren die Pflanzen beim Beimpfen nur 5 Tage alt (VN 1), so fand sich (Abb. 7) ein schwach ausgeprägtes Maximum des Befalls bei einer täglichen Belichtung während 7 Std (7 Lst.)¹, Abfall gegen 2 einerseits und 12, 17 und 22 Lst. andererseits. Wurde erst am 7. Tage nach dem Auflaufen geimpft (VN 2), so traten die Verhältnisse wesentlich klarer hervor (Abb. 8)²: Der Abfall der Kurve von 7 gegen 22 Lst. verläuft nahezu linear. Während bei Versuch VN 3 (Impfen am 10. Tage, Abb. 9) das Bild im wesentlichen unverändert ist, trat nach 15 tägiger Vorbehandlung

¹ 1 Lst. wird im folgenden als Abkürzung für die täglichen Lichtstunden verwandt.

² In den graphischen Darstellungen sind die Kurven der Einzelversuche gestrichelt, die Mittelwertkurven ausgezogen.

(VN 4) eine Änderung des Kurvenverlaufes im Langtag auf (Abb. 10): Die Befallsintensität war ganz besonders im 17 stündigen Tag — weniger im 22 stündigen — gesteigert. Da die Befallswerte in VN 4 im Langtag etwa um das Doppelte höher lagen als in Versuch VN 3, wurde vermutet,

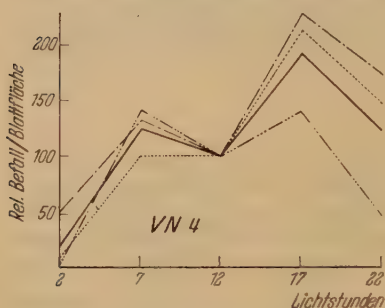


Abb. 10.

Abb. 10. Wie Abb. 7. Alter der Pflanzen beim Impfen 15 Tage (VN 4). Alle Differenzen sind mit $P < 0,0027$ gesichert.

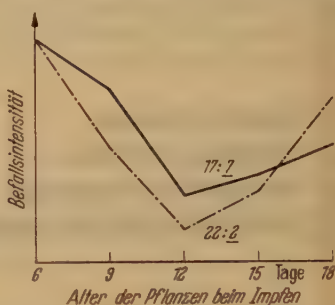


Abb. 11.

Abb. 11. Befallsintensität bei verschiedenem Alter der Pflanzen. Die Pflanzen erhielten 17 bzw. 22 Std tägliche Belichtung vor und nach dem Impfen. Beim Impfen waren die Pflanzen 6, 9, 12, 15 und 18 Tage alt. Die Differenzen der gestrichelten Kurve sind nicht gesichert. Für den Belichtungsrythmus 17:7 ergeben sich die P-Werte: $< 0,0027$; $< 0,0027$; $< 0,0027$; $0,07$.

daß sich dieser durchaus unerwartete Anstieg auch zeigen würde, wenn man unter gleichen photoperiodischen Bedingungen Pflanzen verschiedenen Alters gleichzeitig impft (Phasendisposition). Für die Belichtungsrythmen 17:7 und 22:2 sind die Ergebnisse in Abb. 11 dargestellt.

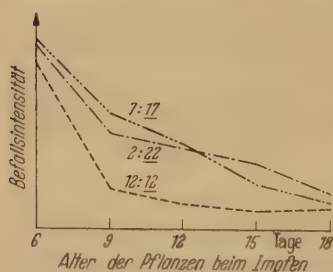


Abb. 12. Befallsintensität bei verschiedenem Alter der Pflanzen. Die Pflanzen erhielten 2, 7 und 12 Std tägliche Belichtung vor und nach dem Impfen. Beim Impfen waren die Pflanzen 6, 9, 12, 15 und 18 Tage alt. Gesichert ist in allen Versuchen die Differenz zwischen 6 und 9 Tagen.

Die Pflanzen waren beim Impfen 6—18 Tage alt; sie wurden alle am gleichen Tage geimpft. Nach einer hohen Jugendanfälligkeit, die, wie später noch zu zeigen sein wird, unter allen photoperiodischen Bedingungen wiederzufinden ist, steigt der Befall bei den mehr als 12 Tage alten Primärblättern tatsächlich wieder stark an. Es kann darin eine Erklärung für die hohe Befallsintensität im Langtag in Versuch VN 4 gesehen werden.

Die täglich nur 2 Std belichteten Pflanzen waren ziemlich stark vergeilt und bauten ihren Körper vorwiegend aus dem Endosperm auf. An ihnen

ließen sich sehr deutlich die Zusammenhänge zwischen verschlechterten Lebensbedingungen und der Stärke des Befalls erkennen. In den Versuchen VN 2—VN 4 sank der Befall von 95 über 40 auf 20 relative

Befallswerte. Exakte Angaben über den Abstieg des Befalls bei verschiedenen alten Pflanzen im 2-, 7- und 12 Std.-Tag finden sich in Abb. 12. Hier haben wir höchsten Befall bei den ganz jungen Blättern (6 Tage alt beim Impfen), der gegen die älteren Blätter (18 Tage alt beim Impfen) unter allen drei Belichtungsrythmen abnimmt.

Ergebnis: Stärkster Befall liegt im Kurztag bei 7 Lst.; etiolierte Pflanzen haben geringeren Befall; im Langtag zeigt die Gerste hohe Altersanfälligkeit.

b) Photoperiodische Behandlung nur vor dem Impfen.

Bei allen Versuchen dieses Abschnittes wurden die Pflanzen nur bis zum Impfen mit den Licht/Dunkel-Rhythmen 2:22, 7:17, 12:12, 17:7 und 22:2 behandelt, dann wurden sie in den Normaltag (also 12:12) gebracht. Alle Pflanzen standen nach dem Impfen nebeneinander unter den gleichen Bedingungen bis zum Auswerten. Die Versuche tragen die Bezeichnung „V“ („vor“).

α.) V 1—V 4. Die Versuche V 1—V 4 (Abb. 13) entsprechen in ihrer Anlage VN 1—VN 4 bis auf die nicht fortgesetzte photoperiodische Behandlung nach dem Impfen. Diese scheinbar geringfügige Variation der

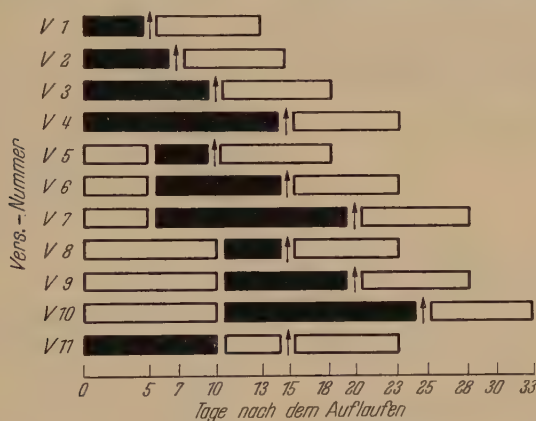


Abb. 13. Schema der Versuche bei photoperiodischer Behandlung *nur vor* dem Impfen. Dunkles Feld: Dauer der photoperiodischen Behandlung, helles Feld: Dauer des Normaltages (12:12), ↑ Zeitpunkt der Impfung. In der oberen Reihe sind also die Pflanzen beim Impfen vom Auflaufen an 5 Tage lang photoperiodisch behandelt gewesen, danach standen sie 8 Tage lang bis zum Auswerten im Normaltag.

Versuchsbedingungen führte zu einem völlig anderen Verlauf der Befallskurven als bei der Versuchsgruppe VN.

V 1. Gleicher Befall (Abb. 14) bei 2, 7 und 12 Lst., Abfall nach 17, schwacher Anstieg gegen 22 Lst.

V 2. Der Befall war im 2 Std.-Tag bedeutend höher als bei V 1, bei 7 Lst. prägte sich ein zweites Minimum aus (Abb. 15), das bei 10-tägiger Photoperiode vor dem Impfen in dem Versuch

V 3 noch deutlicher hervortrat (Abb. 16). Durch die Summenkurve in V 3 wird bereits angedeutet, daß mit Ausnahme des 7 Std.-Tages der Befall von 2 nach 17 Lst. abnimmt. Schließlich brachte der Versuch

V 4 (Abb. 17) die Annäherung an den linearen Abfall, der hier wie in V 1—V 3 bei 17 Lst. endet, um gegen 22 wieder anzusteigen.

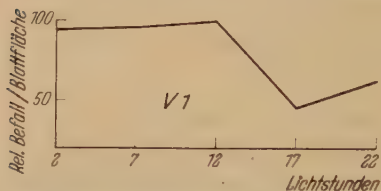


Abb. 14. Befallsintensität bei verschiedener Dauer der täglichen Belichtung. Alter der Pflanzen beim Impfen 5 Tage. Photoperiodische Behandlung nur vor dem Impfen (V 1). P-Werte: 0,9; 0,7; < 0,0027; 0,03.

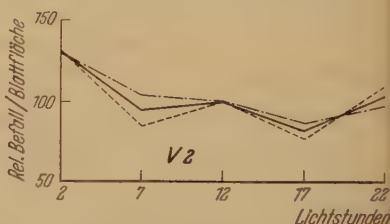


Abb. 15. Wie Abb. 14. Alter der Pflanzen beim Impfen 7 Tage (V 2). P-Werte: < 0,0027; 0,5; 0,04; 0,01.

Auch für diese Versuchsgruppe sollten die Ursachen für den jeweiligen Kurvenverlauf ergründet werden; so vor allem der relative Abstieg des Befalls im 7 Std.-Tag von V 2—V 4 gegenüber dem im 12 Std.-Tag. Die Versuche mit 6—18 Tage alten Pflanzen, die in Tab. 2 zusammengefaßt sind, zeigen mit sehr großer Einheitlichkeit hohen Befall bei den jüngsten Blättern (junge Pflanzen), der unter allen Belichtungsrythmen (täglich 2 bis 22 Lst.) gegen die 18 Tage alten Blätter abnimmt.

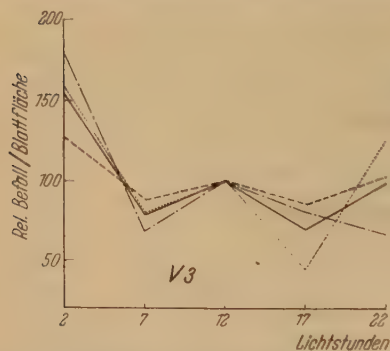


Abb. 16. Wie Abb. 14. Alter der Pflanzen beim Impfen 10 Tage (V 3). Alle Differenzen sind mit $P < 0,0027$ gesichert.

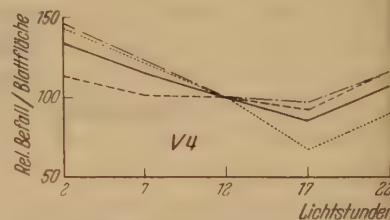


Abb. 17. Wie Abb. 14. Alter der Pflanzen beim Impfen 15 Tage. P-Werte: 0,08; 0,008; < 0,0027; 0,0027.

Die Verhältnisse entsprechen ganz dem in Abb. 12 gezeigten Typus (große Befallsunterschiede zwischen 6 und 9 Tage alten Pflanzen, geringere zwischen 9 und 18 Tage alten Pflanzen). Von dieser Tendenz werden alle anderen, schwach ausgeprägten Befallsunterschiede überdeckt. Bei entsprechend oft wiederholten und gesicherten Versuchen ließen sich aus der Lage der Befall-Alters-Kurven zueinander Rückschlüsse auf die Wirkung der Photoperiode bei verschieden alten Pflanzen ziehen; doch ist das nicht das eigentliche Ziel der Untersuchungen.

Tabelle 2. *Befallsintensität bei verschiedenem Alter der Pflanzen.*

Die 6—18 Tage alten Pflanzen erhielten je nach Versuch 2, 7, 12, 17 oder 22 Std Licht innerhalb von 24 Std vom Auflaufen bis zum Impfen und waren beim Impfen 6, 9, 12, 15 und 18 Tage alt. Die mit einem Stern versehenen Differenzen sind gut gesichert.

Alter der Wirtspflanzen	Mittelwerte der Befallsintensitäten bei Belichtung				
	2:22	7:17	12:12	17:7	22:2
6 Tage	1,54 ± 0,15	0,51 ± 0,06	0,40 ± 0,04	—	0,15 ± 0,026
9 „	1,15 ± 0,09	0,36 ± 0,04	0,17 ± 0,02*	0,20 ± 0,02	0,10 ± 0,018
12 „	0,76 ± 0,07*	0,38 ± 0,03	0,20 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,06 ± 0,012
15 „	0,71 ± 0,07	0,29 ± 0,04	0,17 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,08 ± 0,015
18 „	0,49 ± 0,05*	0,20 ± 0,02	0,10 ± 0,01*	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,008*

Der W-förmige Verlauf der Kurven, der auch bei Wiederholungen der Versuche stets erhalten blieb (siehe auch in V 5 und V 6), brachte nach den klaren Verhältnissen der VN-Versuche Komplikationen mit sich, die es wünschenswert erscheinen ließen, die Realität des Kurvenverlaufes noch in anderer Weise zu sichern. Zu diesem Zweck wurde der Versuch V 3 in zwei Teilversuche zerlegt, in denen die Dauer der täglichen Belichtung statt um 5 nur um jeweils 2 Std verschoben war. Die Ergebnisse stimmten mit denen von V 3 auch unter diesen Bedingungen gut überein.

β) V 5—V 7. Bei den Versuchen V 5, V 6 und V 7 (Abb. 18) wurde vor den Beginn der photoperiodischen eine 5tägige Normaltag-Behandlung eingeschoben (12:12); dadurch waren die Pflanzen bei der entscheidenden Behandlung älter. Es ergab sich so die Möglichkeit zu klären, ob sich die unter V 1—V 4 gefundenen Maxima und Minima verstärken lassen, und ob man es in der Hand hat, die Richtung der einmal eingeschlagenen Entwicklung — in diesem Falle die durch den Normaltag induzierte — kurzfristig zu ändern. Wie aus Abb. 18—20 zu ersehen ist, ergab sich eine völlige Übereinstimmung mit den Versuchen V 1—V 4. Eine verstärkte Ausprägung der Kurven konnte also nicht gefunden werden. Besondere Beachtung verdient einerseits der Versuch V 7 (Abb. 20), dessen Ergebnis erkennen läßt, daß nach 15 tägiger photoperiodischer Behandlung der Abfall Kurztag gegen Langtag auch hier fast linear verläuft; andererseits V 5 (Abb. 18), bei dem die Befallsintensität in 2, 7 und 12 Lst. nur geringfügige Unterschiede aufwies.

γ) V 8—V 10. Zur Ergänzung von V 5—V 7 wurden V 8, V 9 und V 10 angesetzt, bei denen der photoperiodischen Behandlung 10 Tage Aufent-

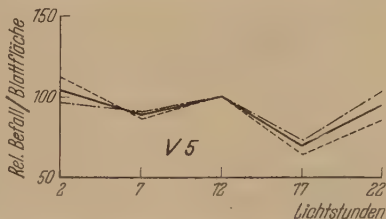


Abb. 18. Befallsintensität bei verschiedener Dauer der täglichen Belichtung. Alter der Pflanzen beim Impfen 10 Tage, photoperiodische Behandlung beginnt erst 5 Tage vor dem Impfen, davor 5 Tage Normaltag (V 5). P-Werte: 0,01; 0,06; < 0,0027; < 0,0027.

halt im 12stündigen Normaltag vorangingen (s. Abb. 13). Die Versuche führten zu einem ganz neuen Typus der Befallskurve:

V 8 (mit 5 Tagen photoperiodischer Behandlung): Vom 2- bis zum 17 Std.-Tag Anstieg des Befalls (Abb. 21). Das heißt aber völlige Umkehr des bisherigen Befundes, nach

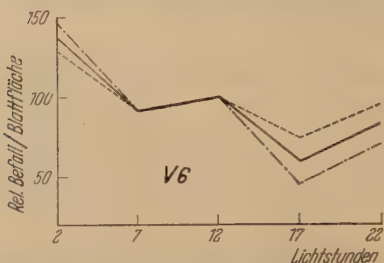


Abb. 19. Wie Abb. 18. Alter der Pflanzen beim Impfen 15 Tage (V 6). P-Werte: $< 0,0027$; 0,2; $< 0,0027$; 0,0027.

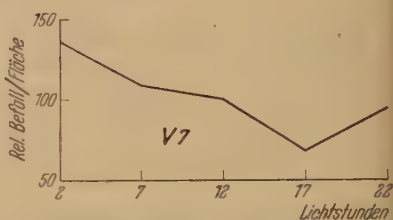


Abb. 20. Wie Abb. 18. Alter der Pflanzen beim Impfen 20 Tage (V 7). P-Werte: 0,01; 0,5; 0,01; 0,02.

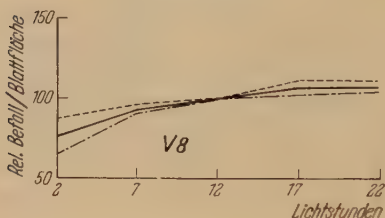


Abb. 21.

Abb. 21. Befallsintensität bei verschiedener Dauer der täglichen Belichtung. Alter der Pflanzen beim Impfen 15 Tage, photoperiodische Behandlung beginnt erst 5 Tage vor dem Impfen, davor 10 Tage Normaltag (V 8). Nur die erste Differenz ist gesichert ($P = 0,006$).

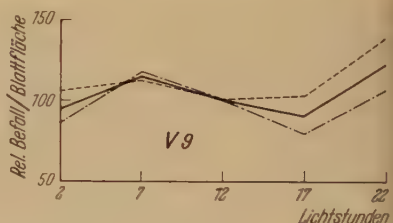


Abb. 22.

Abb. 22. Wie Abb. 21. Alter der Pflanzen beim Impfen 20 Tage (V 9). Nur die letzte Differenz ist gesichert ($P = 0,006$).

dem der Befall im Kurztag stets größer war als im Langtag! Aber schon in

V 9, wo auf den 10tägigen Normaltag eine ebensolange photoperiodische Behandlung folgte, ergab sich wieder folgender Kurvenverlauf:

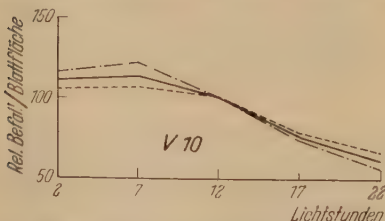


Abb. 23. Wie Abb. 21. Alter der Pflanzen beim Impfen 25 Tage (V 10). P-Werte: 0,2; 0,02; $< 0,0027$; $< 0,0027$.

Abfall von 7 über 12 nach 17 Lst. (Abb. 22). Bemerkenswert und von V 1—V 7 verschieden ist hier der Abfall im 2 Std.-Tag. Schließlich spiegelte der Versuch

V 10 Verhältnisse wider, die durch den linearen Verlauf und den Abfall von 7 über 12 nach 17 und 22 Lst. zu den VN-Versuchen zurückführen (Abb. 23).

Durch Versuche mit verschieden alten Pflanzen konnte für V 8—V 10 das schon unter den V-Bedingungen erhaltene Ergebnis bestätigt werden:

Die jungen Pflanzen zeigten hohe, die alten niedrige Befallsintensität. Die Einzelwerte sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3. *Befallsintensität bei verschiedenem Alter der Pflanzen.*

Die Pflanzen aller Versuche erhielten nach dem Auflaufen 10 Normaltage und kamen dann je nach Versuch in einen 2-, 7-, 12-, 17- oder 22-Std-Tag von 6, 9, 12 und 15 Tagen Dauer. Die mit einem Stern versehenen Differenzen sind gesichert.

Alter der rtpflanzen	Mittelwerte der Befallsintensitäten bei Belichtung				
	2:22	7:17	12:12	17:7	22:2
+ 6 Tage	0,55 ± 0,05	0,41 ± 0,05	0,55 ± 0,05	0,71 ± 0,06	1,71 ± 0,10*
+ 9 „	0,53 ± 0,05	0,37 ± 0,04*	0,36 ± 0,04*	0,46 ± 0,04	1,95 ± 0,13*
+ 12 „	0,55 ± 0,06	0,23 ± 0,04	0,28 ± 0,03*	0,35 ± 0,04*	1,36 ± 0,08*
+ 15 „	0,49 ± 0,05	0,18 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,59 ± 0,06

δ) V 11. Zur Klärung der in V 5—V 7 aufgeworfenen Frage nach der photoperiodischen Nachwirkung wurde der Versuch V 11 angeschlossen (siehe Abb. 13). Bei ihm wurden die Pflanzen, die eingangs 10 Tage unter den 5 Photoperioden gestanden hatten, für 5 Tage in den Normaltag gebracht und erst nach dieser Zeit beimpft. Es ergab sich auch hier die für die V-Versuche charakteristische W-Form der Kurve.

Ergebnis: Pflanzen, die nur vor dem Impfen im extremen Kurztag gestanden haben, zeigen sehr hohen Pilzbefall. Im Langtag liegt das Minimum des Befalls allgemein bei 17 Std täglicher Belichtung. Wird vor die Photoperiode ein 10tägiger Normaltag gelegt, vermag sich die Wirkung der photoperiodischen Behandlung nur nach langer Einwirkung (10 bis 15 Tage) durchzusetzen; im 2stündigen Kurztag bleibt der Befall unter diesen Bedingungen gering. Photoperiodische Nachwirkung ist schwach ausgeprägt.

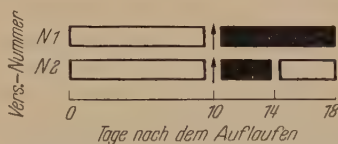


Abb. 24. Schema der Versuche bei photoperiodischer Behandlung nur nach dem Impfen.

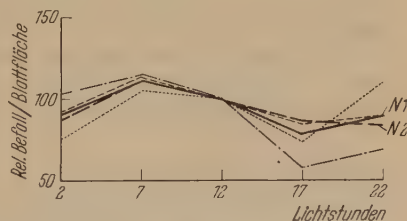


Abb. 25. Befallsintensität bei verschiedener Dauer der täglichen Belichtung. Alter der Pflanzen beim Impfen 10 Tage. Photoperiodische Behandlung nur nach dem Impfen während 8 Tagen (N 1) und 4 Tagen (N 2). P-Werte für N 1: < 0,0027; 0,03; < 0,0027; 0,02; für N 2: 0,03; 0,01; 0,3; 1.

c) Photoperiodische Behandlung nur nach dem Impfen.

Das Schema der Versuchsanordnung „N“ („nach“) gibt Abb. 24. Wegen der kurzen Dauer bis zum Sichtbarwerden der Pusteln nach dem Impfen gibt es nur geringe Möglichkeiten, die Versuchsbedingungen zu variieren. Eine dreifache Wiederholung des Versuches N 1 ist in Abb. 25 wieder-

gegeben. N 2, in dem nur während der ersten 4 Tage nach dem Impfen verschiedene Lichtbedingungen geboten wurden, ergab, daß bereits in dieser kurzen Zeit der für die Befallsintensität verantwortliche Zustand in der Wirtspflanze geschaffen werden konnte. Hohe Befallsintensität bei 7 Lst. mit Abfall gegen den extrem kurzen und den langen Tag ist beiden Versuchen gemeinsam.

Ergebnis: Die Befallskurve der nur nach dem Impfen behandelten Pflanzen zeigt ebenso wie die des Versuches V 9 (Abb. 22) geringen Befall im 2stündigen Kurztag, Maximum des Befalls bei 7, Minimum bei 17 Lichtstunden.

d) Ernährungsversuche.

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die unter den VN-Bedingungen erhaltene geringe Befallsintensität im 2 Std.-Tag einerseits und im 17 Std.-Tag andererseits auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden kann. Außerdem sollte der Unterschied in der Befallsintensität, der zwischen 2 und 17 Lst. in Versuch V 3 (Abb. 16) besonders deutlich in Erscheinung tritt, qualitativ dargestellt werden.

Die Pflanzen wurden in den entsprechenden Photoperioden angezogen, nach 10 Tagen wurden die Primärblätter abgetrennt und aus ihnen 4 cm lange Stücke herausgeschnitten. Die Blattstücke aller Pflanzen (2 und 17 Lst.) wurden auf einer Platte ausgelegt und dicht mit Sporen bestäubt. Je 8—10 Streifen der 2 Std. Pflanzen kamen in 12 PETRI-Schalen, von denen 6 mit Wasser, 6 mit einer 10%igen Glucoselösung gefüllt waren. Die eine Hälfte der mit Wasser sowie der mit Zuckerlösung gefüllten Schalen kam unter sonst gleichen Bedingungen ins Dauerdunkel, die andere in den Normaltag. In gleicher Weise wurde mit den 17 Std.-Pflanzen verfahren.

Da die auf etiolierten Blättern entwickelten Pusteln nur sehr schlecht sichtbar sind, wurde nach Farbstoffextraktion der Blätter das Pilzmycel auf dem Blatt mit Lactophenol-Anilinblau gefärbt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengestellt.

Tabelle 4. *Pustelentwicklung auf Blättern verschiedener Vorbehandlung (2:22 und 17:7), im Licht und Dunkeln sowie auf Wasser- und Zuckerlösung.*

Die Zahl der Kreuze gibt die Intensität des Befalls an.

2:22				17:7			
Normaltag		Dauerdunkel		Normaltag		Dauerdunkel	
Wasser	Zucker	Wasser	Zucker	Wasser	Zucker	Wasser	Zucker
+++	++++	—	+++	+	+	—	—

Aus dem Versuch ergibt sich:

1. Standen nach dem Impfen die Blätter von 2 Std. lang beleuchteten Pflanzen im Normaltag und im Wasser, so war der Befall sehr viel höher als bei den 17 Std. beleuchteten.

2. Kamen die Blätter aus dem 2stündigen Kurztag nach dem Impfen ins Dunkle und auf Wasser, so zeigten sie geringen Befall.

3. Durch Zucker ließ sich der geringe Befall der etiolierten Blätter (2 Std tägliche Belichtung) im Dunkel heben, nicht jedoch bei Pflanzen aus dem 17stündigen Langtag.

Schließlich gaben die gefärbten Blattstücke einen weiteren sehr erwünschten Hinweis: Blätter, auf denen im ungefärbten Zustand nur wenige Pusteln zu erkennen waren, zeigten gefärbt über die ganze Blattfläche verteilt ganz schwachen Pilzbefall ohne Conidienbildung. Damit ist der Verbleib der großen Zahl aufgebrachter Sporen durchaus nicht mehr so ungeklärt: Es gelingt offenbar nur einem geringen Teil, sich zu makroskopisch sichtbaren Pusteln zu entwickeln.

2. Untersuchungen an dem Krankheitserreger.

a) Die Wirkung des Lichtes auf den Pilz.

Zur richtigen Beurteilung der Ergebnisse muß man wissen, ob Wachstumsprozesse des Pilzes unmittelbar lichtabhängig sind.

Zur Klärung dieser Frage kann man 1. die Keimung der Conidien unter verschiedenen Lichtbedingungen und 2. das Pilzwachstum auf der Wirtspflanze beobachten. Der ersten Möglichkeit haftet allerdings der Mangel an, daß der Keimschlauch nicht dem späteren Oberflächenmycel gleichgesetzt werden darf. Trotzdem hat es nicht an Versuchen gefehlt, *Erysiphe*sporen im Licht und Dunkel und bei verschiedenen Wellenlängen keimen zu lassen (NEGER 1902, HEY und CARTER 1931, CHEREWICK 1944, PRATT 1944). Verfolgt man das Hyphenwachstum auf der Wirtspflanze, so ist kaum zu entscheiden, ob das Licht direkt oder indirekt über den Wirt wirkt. Die Deutung der entsprechenden Versuche von YARWOOD (1936) ist allerdings nicht kompliziert: Die Hyphen wuchsen im Licht wie im Dunkel gleich gut! Eigene Beobachtungen bestätigten diesen Befund und zeigten im übrigen, daß die Conidienträger positiv phototrop wachsen.

Auf einem anderen Wege sollten die folgenden einfachen Versuche Aufklärung bringen:

Nach 10tägiger Aufzucht im Normaltag wurde über zahlreiche Primärblätter in 3 Versuchen ein 5 mm breiter Streifen aus a) Stanniol, b) farblosem Cellophan, c) lichtundurchlässigem, aber luftdurchlässigem Stoffgewebe gelegt, nach dem die Blätter mit Sporen bestäubt worden waren.

Die Auswertung ergab unter dem Stanniol und Cellophan kümmerliche Entwicklung des Pilzes und unter dem lichtundurchlässigen Gewebe ein gleich gutes Wachstum wie im unbehandelten Teil des Blattes. Diese Beobachtungen sprechen für eine hohe O_2 - bzw. CO_2 -Empfindlichkeit (siehe auch CORNER 1935) und gegen eine Lichtempfindlichkeit des Pilzes.

Die Anzahl der Pusteln war an der Blattunterseite regelmäßig geringer als an der Oberseite. Das Verhältnis war aber unabhängig von der Dauer der täglichen Belichtung 1:2,3 ($\pm 0,2$).

b) Untersuchungen über die Sporenkeimung.

Von zahlreichen Pilzen ist bekannt, daß sich die Ausbildung ihrer Sporen in einem diurnalen Rhythmus vollzieht. Dabei hat sich herausgestellt, daß sich die Eigenschaften der Sporen im gleichen Wechsel ändern.

Die Verhältnisse sind für einige *Peronosporaceen* von WESTON (1923, 1924), für die Ascusreifung von *Taphrina deformans* und die Conidienabschnürung von *Erysiphe polygoni* von YARWOOD (1936, 1941) und für weitere *Erysiphaceen* von CHILDS (1940) beschrieben worden. Auf der Suche nach einem ähnlichen Rhythmus bei *Erysiphe graminis* fanden YARWOOD und COHEN (1949), daß Sporen, die von befallenen Blättern zu verschiedenen Tageszeiten abgenommen wurden, auf einem Lecithin-Fructose-Agar eine von der Tageszeit abhängige Förderung des Keimschlauchwachstums zeigten. Ein endonomer Rhythmus des Pilzes ist dabei zwar nicht völlig ausgeschlossen, aber doch sehr unwahrscheinlich. Wurde nämlich bei

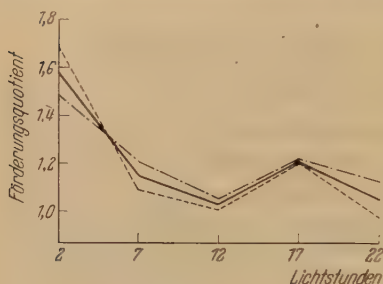


Abb. 26.
Förderungsquotienten des Keimschlauchwachstums für die Versuchsbedingung V 3.
P-Werte: < 0,0027; 0,06; < 0,0027; 0,09.

pflanze tagesrhythmische Schwankungen der physiologischen Aktivität und stofflichen Zusammensetzung vorliegen. Dieses Gebiet wird heute vor allem durch die Untersuchungen der endogenen Rhythmik der Pflanzen in Verbindung mit dem Photoperiodismus intensiv bearbeitet. Welche im Tagesrhythmus schwankenden Prozesse im vorliegenden Falle die Sporenbildung am stärksten beeinflussen, bleibt uns verschlossen. Die genaue Analyse wird durch den Umstand erschwert, daß die Rhythmen der kranken Pflanze gegenüber der gesunden beträchtlich verschoben sind, wie JOHNSTON und MILLER (1940) für den diurnalen Gang der Transpiration bei Rostbefall nachgewiesen haben.

Wenn es also grundsätzlich möglich ist, die physiologischen Eigenschaften der Sporen von der Wirtspflanze her zu beeinflussen, so sollte das auch im Experiment mit verschiedenen Photoperioden gelingen.

Die Keimungsteste wurden nach der von YARWOOD und COHEN (1949) gegebenen Anweisung durchgeführt. Die Methode besteht im Prinzip darin, daß Sporen von der gleichen Wirtspflanze auf einen Lecithin-Fructose-Agar und einen Wasser-Agar aufgestäubt werden. Nach einer bestimmten Bebrütungsdauer werden die auf dem Lecithin-Fructose-Agar und die auf dem Wasser-Agar gebildeten Keimschlauchlängen der Sporen gemessen und in ihrer rein zufälligen Reihenfolge zueinander in Beziehung gesetzt. In den eigenen Versuchen wurde der so erhaltene Wert Förderungsquotient genannt. Für den in Abb. 26 dargestellten Versuch heißt das: Anzucht der Pflanzen im 2-, 7-, 12-, 17- und 22-Std-Tag, Beimpfen 10 Tage nach dem

Erysiphe polygoni im 12:12-Rhythmus Tag und Nacht vertauscht, so folgte die Conidienbildung dem neuen Rhythmus, der im Dauerdunkel und Dauerlicht völlig erlischt (YARWOOD 1936). Es läßt sich deshalb bei einem obligaten Parasiten vermuten, daß sich der jeweilige physiologische Zustand der Wirtspflanze der Pilzspore mitteilt. Diese Annahme setzt voraus, daß erstens zwischen Wirt und Parasit ein sehr enges Verhältnis besteht (die als Matrifikalmodifikationen beschriebenen Beobachtungen von HAMMARLUND 1925 und VOLK 1931 an *Erysiphe graminis* machen diese Annahme sehr wahrscheinlich), und zweitens müssen bei der Wirts-

Auflaufen (siehe Abb. 13), nach Bildung der Sporen Bestäuben des Agars (in PETRI-Schalen), Ausmessen der Keimschlauchlängen der unter den 5 Lichtbedingungen gebildeten und auf dem Lecithin-Fructose-Agar und Wasser-Agar ausgekeimten Sporen (je PETRI-Schale 30 Messungen).

Abb. 26 zeigt, daß erstens eine Wiederholung des Versuches nahezu gleiche Förderungsquotienten ergibt, daß die Mittelwerte trennbar verschieden sind, und daß schließlich der durch die Photoperiode induzierte physiologische Zustand der Wirtspflanze offenbar für die Förderung des Keimschlauchwachstums grundsätzlich eine Rolle spielt. Da es sich herausstellte, daß die Förderungsquotienten in einer negativen Korrelation zu den oben erhaltenen Befallswerten stehen, wurden in die Abb. 27—31 beide Kurven aufgenommen. Auf die Bedeutung dieser Korrelation soll später eingegangen werden. Zuvor sei auf folgende Befunde hingewiesen:

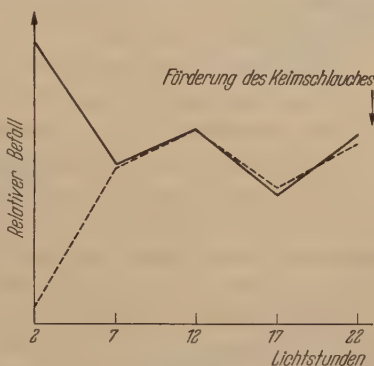


Abb. 27. Versuchsbedingung V 3. P-Werte: siehe Abb. 26.



Abb. 28. Versuchsbedingung V 9. P-Werte: 0,01; 0,005; 0,3; 0,3.

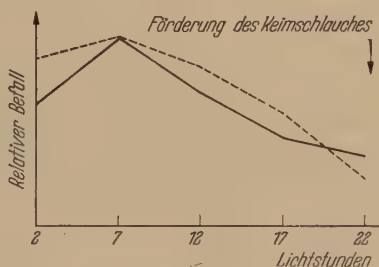


Abb. 29. Versuchsbedingung VN 2. P-Werte: 0,2; < 0,0027; < 0,0027; 0,003.

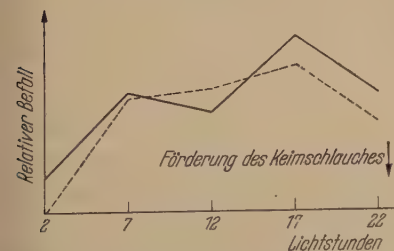


Abb. 30. Versuchsbedingung VN 4. P-Werte: < 0,0027; 0,2; 0,09; 0,01.

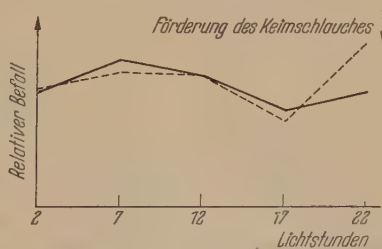


Abb. 31. Versuchsbedingung N 1. P-Werte: 0,5; 0,8; 0,01; < 0,0027.

Abb. 27—31. Zusammenstellung der unter gleichen Lichtbedingungen erhaltenen Kurvenbilder der Befallsintensitäten (Mittelwertkurve ausgezogen) und der Förderungsquotienten (gestrichelt) aus den Sporenkeimungsversuchen. Die Förderungsquotienten wurden mit umgekehrtem Maßstab auf der Ordinate aufgetragen. Die P-Werte gelten nur für die Differenzen der Förderungsquotienten.

1. Die Wachstumskurven der auf Wasser-Agar gekeimten Sporen hatten in verschiedenen Versuchen nicht den gleichen Verlauf.

2. Dasselbe gilt für die Keimschlauchlängen auf Lecithin-Fructose-Agar.

3. Allen Versuchen gemeinsam war eine sehr geringe Keimschlauchlänge all der Sporen, deren Wirtspflanzen zu irgendeiner Zeit im 2 Std-Tag gestanden hatten. Zugleich erwiesen sich diese Sporen fast ausnahmslos als maximal gefördert.

Es muß also angenommen werden, daß der physiologische Zustand der Wirtspflanze, der in irgendeiner Weise auf die Sporen übertragen und in ihnen festgelegt ist, sich ganz spezifisch in der Förderung dieser Sporen auf einem nährstoffreichen Agar auswirkt.

Geht man von der einfachen Vorstellung aus, daß die Sporen, die durch Lecithin und Fructose stimuliert werden können, von der Wirtspflanze mangelhaft ausgestattet sind, so ließe sich folgern, daß auf einem nährstoffarmen Blatt Sporen gebildet werden, die ungeachtet sonstiger, die Keimung fördernder Potenzen einen hohen Förderungsquotienten haben. Wenn andererseits die Intensitätsverschiebungen des Pilzbefalls unter verschiedenen Photoperioden nährstoffabhängig sein sollten, so müßte zwischen den Befalls- und Förderungskurven folgender Zusammenhang bestehen:

Niedriger Nährstoffgehalt könnte zu einem geringen Befall und zu einer hohen Förderung der Sporenkeimung führen.

Tabelle 5. *Förderungsquotienten von Sporen, die auf verschiedenen alten, im Langtag (17:7) und Kurztag (7:17) aufgewachsenen Pflanzen gebildet worden waren.*

Gesamt-P (Langtag) 0,0027; (Kurtzag) 0,009.

Alter der Wirtspflanzen	Mittelwerte der Förderungsquotienten	
	im Langtag	im Kurztag
5 Tage	$1,28 \pm 0,05$	$1,27 \pm 0,07$
15 „	$1,59 \pm 0,06$	$1,49 \pm 0,07$
5 „	$1,13 \pm 0,05$	$1,19 \pm 0,07$
15 „	$1,46 \pm 0,05$	$1,32 \pm 0,07$
5 „	$1,01 \pm 0,05$	$1,25 \pm 0,09$
15 „	$1,19 \pm 0,05$	$1,45 \pm 0,11$

Zur Ergänzung der Versuche, in denen die Befallsintensität ein Kriterium für die Wirksamkeit der photoperiodischen Behandlung und altersmäßigen Abstufung der Versuchspflanzen abgab, wurden Keimversuche mit Sporen angestellt, die im Langtag (17 Std Licht) und im Kurztag (7 Std) auf verschiedenen alten Pflanzen gebildet worden waren. Die dreifach wiederholten Versuche, die in der Tab. 5 zusammengestellt sind, ergaben für den Kurztag Verhältnisse, wie sie aus den Infektionsversuchen zu erwarten waren: Hohe Förderung der Keimschlauchlänge

bei alten Pflanzen, geringe bei jungen Pflanzen. Zu gleichen Ergebnissen kommt man auch bei den im Langtag aufgezogenen Pflanzen. Es ist mithin naheliegend, daß für die günstige Entwicklung des Pilzes auf gealterten Langtagpflanzen der Ernährungsfaktor nicht herangezogen werden darf.

3. Untersuchungen über die stoffliche Zusammensetzung der gesunden Wirtspflanze unter verschiedenen photoperiodischen Bedingungen.

Über die biochemischen Verhältnisse in den photoperiodisch behandelten Pflanzen, die sich vielleicht auf die parasitischen Pilze auswirken könnten, läßt sich wenig aussagen.

In älteren Arbeiten (ARTHUR, GUTHRIE und NEWELL 1930, HURD-KARRER und DICKSON 1934) wird für Gerste und Weizen berichtet, daß die Pflanzen im Kurztag (7 Lst.) den höchsten Gehalt an Gesamtstickstoff haben, daß dieser gegen den Langtag abnimmt, bei 17 Lst. ein Minimum hat und von da an wieder ansteigt, wenn die Pflanzen länger als 17 Std belichtet werden. Die Gesamtkohlenhydrate stiegen hingegen bis zu 17 Lst. an, dann erfolgte der Abfall über 19 nach 24 Lst.

Nach eigenen Untersuchungen an den Primärblättern der Gerste folgte sowohl der prozentuale Anteil an Trockensubstanz als auch der Gehalt an Assimilationsfarbstoffen der Kohlehydratkurve (Tab. 6).

Tabelle 6. *Assimilationsfarbstoffe und Trockensubstanz bei Pflanzen verschiedener photoperiodischer Vorbehandlung.*

Photo- periode	Assimilationsfarbstoffe, bezogen auf Frischgewicht		Trockensubstanz	
	Anzahl der Versuche	Extinktion der Lösung	Anzahl der Einzelpflanzen	Prozentualer Anteil Trockensubstanz
2: <u>22</u>	3	30,7 ± 0,9	101	5,9 ± 0,11
7: <u>11</u>	3	51,5 ± 0,8	101	6,3 ± 0,11
12: <u>12</u>	3	57,2 ± 0,1	114	6,9 ± 0,10
17: <u>7</u>	3	63,2 ± 0,9	128	7,7 ± 0,14
22: <u>2</u>	3	56,7 ± 1,2	96	6,3 ± 0,11

Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Analyse 15 Tage alt, sie standen während der ganzen Zeit unter den angegebenen Lichtbedingungen. Direkte Beziehungen zu den Befallskurven ergaben sich nicht.

In der Annahme, daß den Vitaminen eventuell auch für die Entwicklung von obligaten Parasiten (vgl. hierzu Arbeiten von GOTTLIEB und HART 1943, HASSEBRAUK 1950/51, PRYOR 1942) eine Bedeutung zukommen könnte, wurde der Gehalt an Riboflavin, Nicotinsäure und Pantothersäure in den unbeimpften Pflanzen 10 Tage nach dem Auflaufen bestimmt (Methoden siehe bei GYÖRGY 1951).

In Tab. 7 sind Mittelwerte des Vitamingehaltes in γ/g Trockengewicht aus 4—5 Einzelbestimmungen, die aber an demselben Pflanzenmaterial

gewonnen wurden, zusammengestellt. Auch aus diesen Analysen ergaben sich keine Hinweise für die Erklärung der entsprechenden Befallskurven.

Tabelle 7. *Gehalt an Riboflavin, Nicotinsäure und Pantothensäure in Pflanzen verschiedener photoperiodischer Vorbehandlung in γ/g Trockengewicht.*

Photoperiode	Riboflavin	Nicotinsäure	Pantothensäure
2: <u>22</u>	15,9	43,4	24,2
7: <u>17</u>	—	50,3	15,9
12: <u>12</u>	20,4	44,8	26,6
17: <u>7</u>	22,5	41,7	29,5
22: <u>2</u>	17,8	50,0	18,8

Da der Wassergehalt sich als sehr unterschiedlich unter verschiedenen photoperiodischen Bedingungen erwies, war eine Bestimmung der osmotischen Werte (kryoskopische Methode) in den Blättern von Interesse. Die Pflanzen waren am Tage der Bestimmung 10 Tage alt. Wegen der weitgehenden Parallelität der Werte wurden die osmotischen Werte in Tab. 8 neben die der Trockengewichte gestellt. Zu den Befallsintensitäten besteht jedoch auch hier keine eindeutige Beziehung.

Tabelle 8. *Osmotischer Wert und Trockengewicht von Pflanzen verschiedener photoperiodischer Vorbehandlung.*

Photoperiode	Anzahl der Versuche	Osmotische Werte in atm.	Trockengewicht	
			Anzahl der Einzelpflanzen	je Einzelblatt in mg
2: <u>22</u>	2	7,41 \pm 0,00	101	8,77 \pm 0,16
17: <u>17</u>	2	7,59 \pm 0,08	101	10,03 \pm 0,18
12: <u>12</u>	2	7,90 \pm 0,01	114	10,35 \pm 0,15
17: <u>7</u>	2	7,61 \pm 0,05	128	9,14 \pm 0,16
22: <u>2</u>	2	7,72 \pm 0,01	96	9,50 \pm 0,17

Aus den Ergebnissen dieser orientierenden Untersuchungen wird — selbst unter der Voraussetzung, daß an der unterschiedlichen Intensität des Befalls keine Abwehrreaktionen der Pflanze beteiligt sind — deutlich, daß die Beziehungen zwischen Wirt und Parasit recht komplizierter Natur sind und nicht mit groben Methoden analysiert werden können.

II. Besprechung der Ergebnisse.

Die bei den vorstehenden Versuchen benutzte Methode der rein zahlenmäßigen Erfassung eines Krankheitsbildes ist nur dann anwendbar, wenn die Symptome im Typ einheitlich und nur in ihrer Intensität verschiebbar sind. Solche Verhältnisse liegen mit hoher Wahrscheinlichkeit dort vor, wo bei eusymbiontischen Partnern (GÄUMANN 1951) die

Reaktionsnorm durch den Typ IV¹ starr festgelegt ist (stabile Systeme). Da die Sommergerste „Morgenrot“ unter normalen Bedingungen gegen den Mehltau hoch anfällig ist (Typ IV), sind die Intensitätsverschiebungen als solche verständlich, denn modifizierte Umweltbedingungen vermögen hier — sowie bei starken Überempfindlichkeitsreaktionen parabolischer Systeme — den Typ nicht mehr zu beeinflussen.

a) *Photoperiode vor und nach dem Impfen.*

Die Ergebnisse der Versuche VN 1—VN 3 (vgl. Abb. 32) zeigen deutlich die Tageslängenabhängigkeit des Mehлтаubefalls: Die Langtag-

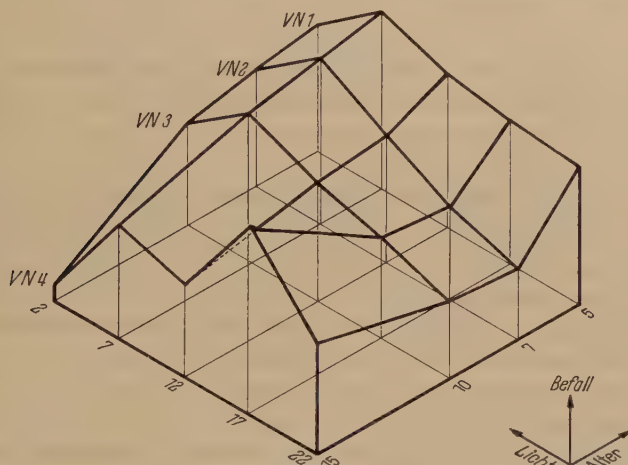


Abb. 32. Dreidimensionale Darstellung der Befallsintensität aus den Versuchen VN 1 bis VN 4.

pflanze Gerste war im 7stündigen Kurztag sehr stark anfällig². Je länger die Dauer der täglichen Belichtung wurde, um so mehr ging der Befall (mit einer Ausnahme) zurück. Diese ganz allgemeine Beobachtung ist schon wiederholt bei den Langtagpflanzen *Triticum*, *Solanum tuberosum* und *S. lycopersicum* gemacht worden (GALLEGLY und WALKER 1949, GRECHUSHNIKOV 1939, GRAINGER 1947, JOHNSON und NEWTON 1940, VOLK 1931).

In einigen Arbeiten finden sich auch Angaben über den Einfluß der Lichtintensität auf den Mehлтаubefall; sie stimmen darin überein, daß bei hohen Lichtstärken der Befall gering, bei niedrigen groß war (HONECKER 1934, TAPKE 1951, VOLK 1931).

Diese Resultate zeigen eine auffällige Parallelität zum C/N-Verhältnis in der Wirtspflanze. Nach den oben zitierten Autoren ist der Gesamtstickstoff einer

¹ Nach den von HONECKER (1937) gebrauchten Kennzahlen des Krankheitsbildes (siehe auch bei GÄUMANN 1951, ROEMER, FUCHS und ISENBECK 1938).

² Über das Verhalten im 2 Std-Tag siehe unten.

Getreidepflanze um so geringer, je länger der Tag ist, in dem sie gewachsen ist. Es bedürfte jedoch genauerer Untersuchungen, ehe sich über mögliche Zusammenhänge Näheres sagen ließe.

In ganz andere Richtung weisen die Versuche von GRECHUSHNIKOV (1939): Kartoffelsorten mit hoher Peroxydase- und Cystoamylaseaktivität erwiesen sich als hochresistent, solche mit geringer Aktivität als anfällig gegen *Phytophthora infestans* (siehe auch bei KAMMERMAN 1953). Im Langtag war die Fermentaktivität stets sehr lebhaft (vgl. CAJLACHJAN u. ALEXANDROVSKAJA 1935), so daß dort die Krankheitsresistenz auch groß war. Dies ist, soweit es sich überblicken läßt, der einzige Fall, in dem eine Korrelation der Anfälligkeit unter bestimmten photoperiodischen Bedingungen mit biochemischen Indikatoren wahrscheinlich gemacht werden konnte.

Unter den 5 Photoperioden der VN-Versuche nimmt der extreme 2stündige Kurztag eine Sonderstellung ein. Die Ursache für die geringen Befallswerte liegt hier wahrscheinlich ganz einfach im Nahrungsmangel¹. Bei nur 2stündiger täglicher Belichtung dürfte die Photosynthese nicht ausreichen, um die notwendigen Assimilate zu schaffen, so daß der Wirt und mit ihm auch der Parasit hungert.

Zu dieser Annahme passen gut die Feststellungen von CHEREWICK (1944), REED (1914) und VOLK (1931), daß Dauerverdunklung die Entwicklung des Mehltaus unterdrückt². Die Bedeutung der Reservestoffe geht auch eindeutig aus den Ernährungsversuchen (S. 300) hervor: Blattstücke etiolierter Pflanzen ergaben im Dunkel auf Wasser geringen Befall, mit Zuckerlösung behandelte dagegen hohen.

Den Folgerungen über die Rolle der organischen Nährstoffe scheinen nun allerdings die Befallswerte im 17stündigen Langtag zu widersprechen: Im Langtag stand dem Pilz ja reichlich Zucker zur Verfügung, dennoch war der Befall gering. Es war auch nicht möglich, diesen geringen Befall durch Zuckergaben zu beheben, so daß man wohl annehmen muß, daß Zucker nur dann einen direkten Einfluß hat, wenn er als axenischer Faktor (GÄUMANN 1951) im Minimum ist.

Der bisher außer Betracht gelassene Versuch VN 4 (Abb. 10) bot ein anderes Bild. Im 17- und 22 Std-Tag lag der Befall hier wesentlich höher als im 12 Std-Tag. Zum Verständnis hierfür können folgende Beobachtungen herangezogen werden:

1. Vom 13. Tage nach dem Auflaufen an ist das Primärblatt „reif“. Es bleibt in diesem Zustand 10 Tage, dann erfolgt Alterung (nach Atmungsmessungen von DUFF und FORWARD 1949).
2. Die Primärblätter trocknen gegen Ende des Versuches ein und vergilben.

Das Primärblatt ist also wahrscheinlich unter Langtagbedingungen nach 15 + 8 Tagen am Ende seiner Lebensfähigkeit. Um diese Annahme

¹ Vgl. die Untersuchungen von YEMM (1950) und McKEE (1950) sowie von DUFF und FORWARD (1949) über den Gehalt an organischer Substanz bei etiolierten Getreidekeimlingen.

² Dabei kann der Chlorophyllmangel als solcher, der bei Verdunklung oder zu kurzer täglicher Belichtung eintritt, nicht die maßgebliche Ursache für das kümmerliche Wachstum des Pilzes sein, denn HAMMARLUND (1925) erhielt auf einer normalen und einer chlorophyllarmen Gerste gleich gute Infektionen.

zu sichern, sind die in Abb. 11 zusammengestellten Versuche durchgeführt worden; sie zeigen, daß unter den gegebenen Bedingungen die Primärblätter eine hohe Altersanfälligkeit aufweisen.

Mit Ausnahme der etiolierten und im Langtag gealterten Blätter zeichnet sich also in der Versuchsgruppe VN hoher Befall im Kurztag und bei jungen Blättern, geringer Befall im Langtag und bei alten Blättern ab.

b) Photoperiode nur vor dem Impfen.

Betrachtet man die Ergebnisse der Versuche V 1—V 11 in den 4 Gruppen:

1. Photoperiode sofort nach dem Auflaufen (V 1—V 4),
2. vor der Photoperiode 5 Normaltage (V 5—V 7),
3. vor der Photoperiode 10 Normaltage (V 8—V 10),
4. nach der Photoperiode vor dem Impfen 5 Normaltage (V 11), so ist in der ersten Gruppe (siehe Abb. 33) der überraschendste Befund der starke Anstieg des Befalls im 2 Std-Tag mit zunehmender Anzahl der Tage photoperiodischer Behandlung vor dem Impfen. Zum Verständnis hierfür können Ergebnisse von GASSNER und GOEZE (1934) herangezogen werden:

Im 2 Std-Tag aufgezogene Pflanzen beginnen nach der Übertragung in den Normaltag sofort mit der Chlorophyllbildung (siehe auch BARRENSCHEEN, PANY und SRB 1942), Assimilation und Transpiration.

In den Versuchen V 1—V 4 liegen die Verhältnisse demnach wohl folgendermaßen:

1. In den Pflanzen herrscht durch den 2stündigen Tag Hungerzustand und dadurch später Hemmung der Pilzentwicklung.
2. Je länger das Hungern vor dem Impfen dauert, desto stärker muß später die Hemmung des Pilzes sein.
3. Im anschließenden Normaltag tritt Erholung von der Hungerperiode ein¹. Sie wird um so schwerer in Gang kommen, je länger das Hungern im 2 Std-Tag gedauert hat; sie dürfte aber für den Pilz höchstens zu den gleichen Lebensbedingungen führen wie er sie auf den 7 Std-Pflanzen findet (auch sie wurden in den Normaltag überführt), — sofern die Pilzentwicklung allein vom Kohlenhydratspiegel abhinge. Tatsächlich entwickelt er sich aber stärker.
4. Also kann das gute Wachstum des Pilzes nicht nur von der Menge der Assimilate abhängen, sondern durch das lange Hungern der Wirtspflanze muß irgend eine, das Pilzwachstum stark fördernde Konstellation entstanden sein.
5. Sie wird verständlich, wenn wir neben der aushungernden Wirkung des 2 Std-Tages auch noch eine „Schädigung“ der Wirtspflanze annehmen und die weitere Annahme machen, daß durch die Schädigung die Pilzentwicklung besonders günstig beeinflußt würde.

¹ Auch die Entwicklung von Viren wird durch präinfektionelle Verdunklung der Wirtspflanzen stark begünstigt (BAWDEN und ROBERTS 1947, 1948, SCHWARTZ und CUZIN 1950, SCHWARTZ, CUZIN und RENNIE 1952, YARWOOD 1952, SILL und WALKER 1952). Bei photoperiodischer Behandlung kann es zu unterschiedlicher Symptomausprägung der Viren kommen (Mc KINNEY 1937, POUND und CHEO 1952).

Es wird noch zu zeigen sein, daß einer Schädigung oder Schwächung für die Höhe der Befallsintensität eine dem Nährstoffspiegel übergeordnete Bedeutung zukommt.

Für den relativ geringen Befall bei 7 gegenüber 12 Lichtstunden in V 2 und V 3 (Abb. 15 u. 16) liegt keine experimentell begründete Erklärung vor. Die Tendenz ist zwar in beiden Versuchen die gleiche, sie ist jedoch statistisch nicht zu sichern. Dehnt man aber die Dauer der photoperiodischen Behandlung genügend lange aus

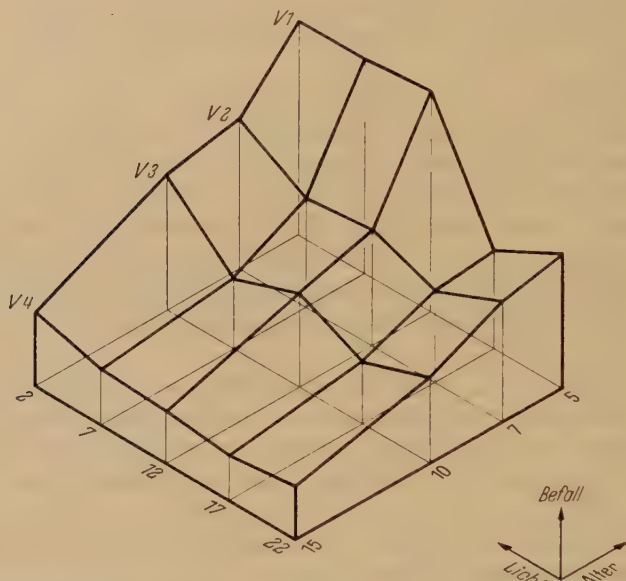


Abb. 33. Dreidimensionale Darstellung der Befallsintensität aus den Versuchen V 1 bis V 4.

(15 Tage in V 4, Abb. 17), so verschwindet die Sonderstellung der 7 Std.-Pflanzen völlig, der Befallswert ist nun größer als im 12 Std.-Tag, die Tendenz der VN-Versuche $7 > 12 > 17$ ist erreicht. Eine allgemeine Bestätigung dieser Ergebnisse bieten die Untersuchungen von FOSTER und WALKER (1949) und GALLEGLY und WALKER (1949).

Man erkennt weiterhin aus diesen, sowie aus den noch zu besprechenden Versuchen V 8, V 9 und V 10, daß:

1. der für den Krankheitsbefall entscheidende physiologische Zustand der Pflanze erst in einem ganz bestimmten Zeitraum „geschaffen“ wird, und daß
2. die Dauer dieser ziemlich trägen Reaktion von den jeweiligen Versuchsbedingungen abhängig ist.

So war z. B. unter den VN-Bedingungen maximaler Befall (im 7 Std.-Tag) schon nach 10 Tagen erreicht (VN 2, Abb. 8) — zusammengesetzt aus den 7 Tagen Prädisposition und bis zum Ende der photoperiodischen Behandlung ergänzt durch

etwa 3 weitere Tage, die in die Infektionszeit fallen —, während unter V-Bedingungen mindestens 15 Tage zum „Aufbau“ des zur gleichen Befallsintensität führenden Zustandes notwendig waren.

Eine weitere Abweichung ist der Anstieg des Befalls im 22- gegenüber dem 17 Std.-Tag (Abb. 14—17). Man könnte an eine Lichtschädigung denken, die sich ähnlich wie das Etiolement auswirkt („Etiolement vert“ im Sinne BONNIERS, 1895), wozu auch die Ergebnisse von ARTHUR, GUTHRIE und NEWELL (1930), PIRSCHLE und WETTSTEIN (1940) sowie von WITHROW und WITHROW (1949) zu berücksichtigen wären. Es lassen sich aber mancherlei Bedenken dagegen anführen, so daß eine endgültige Klärung vorläufig noch nicht möglich ist.

Trotz der Schwierigkeit, die prädisponierte Pflanzen einer Interpretation im einzelnen entgegenstellen, tritt doch die schon früher herausgestellte Tendenz — geringer Befall bei langen Tageslängen und alten Pflanzen — in der räumlichen Darstellung (Abb. 33) recht deutlich hervor.

2. Gruppe: Vor der Photoperiode 5 Normaltage (V 5—V 7).

Die 5tägige Behandlung der Pflanzen mit dem „normalen“ Licht/Dunkel-Wechsel 12:12 vor der photoperiodischen Behandlung und dem Impfen war auf die Entwicklung des Pilzes ganz ohne Einfluß. Damit wird die Angabe von RASUMOV (1930) bestätigt, wonach eine photoperiodische Nachwirkung beim Getreide erst nach 7 Behandlungstagen zur Geltung kommt.

3. Gruppe: Vor der Photoperiode 10 Normaltage (V 8—V 10).

Wenn die Pflanzen 10 Tage lang im Normaltag gestanden haben, so ist zu erwarten, daß der physiologische Zustand „Normaltag“ nicht durch eine kurzfristige Änderung der täglichen Belichtungsdauer verschoben werden kann. Tatsächlich findet man in V 8 (Abb. 21) mit nur 5tägiger photoperiodischer Behandlung einen gleich hohen Befall von 12—22 Lst. mit leichtem Abfall über 7 nach 2 Lst. Dieser Abstieg muß auch hier als ein Zeichen dafür gewertet werden, daß unter den extremen Kurztag-Bedingungen entscheidende Stoffe fehlen. Diese Vorstellung ließ sich bereits aus VN 1—VN 4 ableiten. Die Erwartung aber, daß sich nach dem erneuten Umstellen in den Normaltag die 2 Std.-Pflanzen wie in V 1—V 4 (starker Anstieg des Befalls!) verhalten müßten, wäre unbegründet, da nach 10tägiger Vorbehandlung im 12 Std.-Tag ein extremer Kurztag keine Schädigung des Blattgefüges durch Etiolement mehr hervorrufen kann.

Dafür gibt es auch in der Literatur Beispiele. So sind nach THOMAS (1921) junge Blätter von *Apium graveolens*, die vor dem Impfen einem 9tägigen Dauerdunkel ausgesetzt waren, gegen *Septoria apii* sehr hoch anfällig, während der Befall in den alten Blättern unter den gleichen Bedingungen herabgesetzt war.

Wurde die Dauer der photoperiodischen Behandlung auf 10 und 15 Tage verlängert, so setzte sich das Minimum des Befalls bei 17 Lst., später auch bei 22 Lst., wieder durch. Mit einer irreversiblen Licht-

schädigung war aus den oben genannten Gründen auch hier nicht zu rechnen. Durch den niedrigen Befall im 2 Std.-Tag wird die Interpretation von V 8 bestätigt. Aus der dreidimensionalen Darstellung der Versuche V 8—V 10 in Abb. 34 wird wieder die konstant zunehmende Resistenz älterer Blätter deutlich. Es besteht darin eine klare Parallele zur Stadienresistenz, d. h. zu der Beobachtung, daß verschieden alte Gewebe eine unterschiedliche Anfälligkeit zeigen (Lit. bei KÜDERLING 1936). Die ontogenetischen Verschiebungen der Anfälligkeit im Primärblatt geben offenbar bereits ein Bild vom Verhalten der ganzen Pflanze. Die Beziehungen

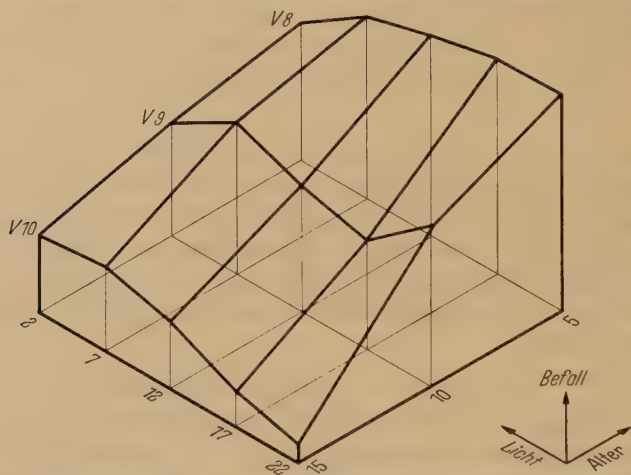


Abb. 34. Dreidimensionale Darstellung der Befallsintensität aus den Versuchen V 8 bis V 10.

zwischen älteren Blättern und Langtagbedingungen (in beiden Fällen geringer Befall) sind auch eindeutig: Die im Langtag gehaltene Pflanze ist „physiologisch älter“.

4. Gruppe: Nach der Photoperiode und vor dem Impfen 5 Normaltage (V 11).

Der Versuch V 11 liefert als Endglied der Versuchsreihe den Beweis dafür, daß mindestens über 5 Tage eine Nachwirkung besteht, wie sie für die Blütenbildung auch beim Getreide hinlänglich bekannt ist. Damit werden zugleich auch die Ergebnisse von V 8 gestützt. Dort hatte sich die Normaltaginduktion als sehr dauerhaft erwiesen.

c) Photoperiode nur nach dem Impfen.

Das Ergebnis der Versuche, in denen die Pflanzen verschiedenen Licht/Dunkel-Rhythmen erst nach dem Impfen ausgesetzt waren, brachte eine weitgehende Übereinstimmung mit Versuch V 9. Diese Tatsache ist nicht überraschend, denn beide Versuche haben Wesentliches

gemein: die 10tägige Vorbehandlung im Normaltag! Nach dieser Vorbehandlung ist es offenbar gleichgültig, ob die für diese Verhältnisse verantwortlichen und vom Licht abhängigen Grundlagen im pflanzlichen Stoffwechsel vor oder nach dem Impfen geschaffen werden. Hier ergänzen sich 4 Versuche in sehr schöner Weise:

V 11 läßt erkennen, daß über 5 Tage eine Nachwirkung besteht. N 2 zeigt, daß bei 4tägiger Behandlung nach dem Impfen der Einfluß der Tageslänge nachweisbar ist, und V 9 und N 1 bestätigen diese Befunde durch weitgehende Parallelität der Befallskurven. Man darf aus diesen Ergebnissen außerdem mit großer Wahrscheinlichkeit schließen, daß

1. das Licht keinen direkten Einfluß auf den Parasiten ausübt (Übereinstimmung mit den Versuchen an partiell verdunkelten Blättern) und daß

2. die Vorstellung über die Geschwindigkeit der oben als relativ träge bezeichneten Reaktion sich schärfer abgrenzen läßt, da einmal der durch den direkten Einfluß der Photoperiode induzierte physiologische Zustand bereits nach 4 Tagen erreicht sein muß (N 2), und da zum zweiten, um überhaupt wirksam zu werden, nicht mehr als 2—3 Tage zur Verfügung stehen (bis zur Ausbildung der Haustorien).

In früheren Arbeiten mit Mehltau (REED 1914, TRELEASE und TRELEASE 1929), mit Rosten (Lit. bei HASSEBRAUK 1940a) und anderen Parasiten (POHJAKALLIO u. a. 1951) wurden meist die Pflanzen nach dem Impfen ins Dauerdunkel gestellt. In fast allen Fällen zeigt sich dann geringer Befall, bzw. hohe Inkubationszeiten¹. Wurde die Tageslänge nach dem Impfen variiert (GASSNER und APPEL 1927, PRATT 1944), so wurden die gleichen Ergebnisse wie in den N-Versuchen erzielt. Interessant ist, daß BEVER (1934) im Langtag eine Verschiebung des Befallstyps von IV auf 0 bekam.

Überträgt man den Befund, daß das Licht wahrscheinlich keinen Einfluß auf den Parasiten hat, auf die Versuche der Gruppe VN, so ergibt sich die Konsequenz, daß die Verschiedenheit der Befallskurven gegenüber den V-Versuchen nicht in einem zusätzlichen Einfluß des Lichtes auf den Parasiten zu suchen ist, sondern allein in den oben diskutierten Verschiebungen des physiologischen Zustandes.

d) Bemerkungen über die Ursachen der Intensitätsschwankungen im Befall.

Die Anzahl der Pusteln je Blattfläche muß abhängen

- A) von der parasitischen Eignung des Erregers,
- B) von der Disposition des Wirtes.

A ist in jedem Versuch durch das Zusammenwirken zahlreicher Faktoren in den Eigenschaften der Sporensuspension festgelegt. Ist die

¹ Beachtung verdienen in diesem Zusammenhange die Ergebnisse der Arbeiten von HASSEBRAUK (1940b) und von SEMPIO (1939) und die Theorie zur Deutung (SEMPIO 1943a, b; 1946).

Intensität der Pustelbildung ein Maß für die Disposition des Wirtes B, so können doch die Ursachen dieser Intensitätsschwankungen sehr verschiedener Natur sein. Es kommen in Frage

1. die axenischen Faktoren der Eindringungs- und Ausbreitungsresistenz,
2. die Abwehrreaktionen der Pflanze.

Das Verhalten der etiolierten Pflanzen zeigt, daß man ungastliche Blätter grundsätzlich (z. B. durch Zuckergaben) in gastliche umstimmen kann und damit eine vorhandene Axenie beseitigt. Die Versuche haben weiterhin erwiesen, daß auf Pflanzen, die zu irgendeiner Zeit im 2 Std-Tag gestanden haben, Sporen mit hohen Förderungsquotienten gebildet werden. Oder, von der Seite des Wirtes her betrachtet: Die überaus hohe Anfälligkeit der im 2 Std-Tag aufgezogenen Pflanzen, die nach dem Impfen in den Normaltag gestellt wurden, kann nicht allein auf einer Verbesserung der Ernährungsverhältnisse beruhen, da dann der Förderungsquotient sehr gering sein sollte. Wir müssen also auch aus diesem Grunde an einer Schwächung des etiolierten Blattes für die Erklärung des hohen Befalls festhalten. Unsere Kenntnisse über die Eindringungsresistenz bieten hierfür eine ausreichende Grundlage.

Während die hohe Jugendanfälligkeit der Gerstenblätter in die Vorstellung geringer Eindringungsresistenz noch aufnehmbar ist, scheint sich durch die Möglichkeit, daß in gewissen Fällen auf ein resistentes Zwischenstadium eine hohe Altersanfälligkeit folgen kann — auch die Literatur bietet hierfür Beispiele (siehe bei GÄUMANN 1951) —, die Interpretation zu erschweren.

Die Gewißheit, daß es im Laufe der Entwicklung eines Blattes, sowie unter verschiedenen photoperiodischen Bedingungen, zu wesentlichen stofflichen Verschiebungen kommt, kann nicht dazu berechtigen, in diesen Verschiebungen allein die Ursachen für die Intensitätsschwankungen des Befalls zu sehen. Allerdings wird durch die enge Korrelation des Befalls mit dem Förderungsquotienten, der das Ergebnis eines sehr empfindlich anzeigenden biologischen Testes ist, sehr wahrscheinlich gemacht, daß die Ursachen der unterschiedlichen Befallshöhe auf axenischen Faktoren beruhen.

Zusammenfassung.

1. An Sommergetreide — *Hordeum sativum*, Sorte „Morgenrot“ — als Wirt und mit *Erysiphe graminis hordei* als Parasiten wurde der Einfluß der Tageslänge sowie des Alters der Pflanzen auf die Intensität des Befalls quantitativ untersucht. Bei den Versuchen kamen 5 verschiedene Licht/Dunkel-Rhythmen (zwischen 2 Std Licht mit 22 Std Dunkelheit und 22 Std Licht mit 2 Std Dunkelheit) zur Anwendung.

2. Die Gerste zeigte im Kurztag (bei 7 Lichtstunden) den höchsten, im Langtag (bei 17 Lichtstunden) den geringsten Mehлтаubefall.

3. Junge Blätter hatten unter allen photoperiodischen Bedingungen hohe, alte Blätter in der Regel geringe Befallsintensitäten.

4. Auf etiolierten Blättern war der Befall gering; als Ursache dafür muß Ausbreitungsresistenz infolge Nahrungsmangels angenommen werden. Auch die Eindringungsresistenz war im etiolierten Blatt herabgesetzt.

5. Photoperiodische Nachwirkungen ließen sich in der Disposition des Wirtes über mindestens 8 Tage nachweisen.

6. Photoperiodische Behandlung, Licht überhaupt, übten keinen direkten Einfluß auf die parasitischen Eigenschaften des Pilzes aus.

7. Über den physiologischen Zustand der Wirtspflanze unter verschiedenen photoperiodischen Bedingungen ließen sich mit Hilfe eines Sporenkeimungstestes Aussagen machen, die Rückschlüsse auf die Ursachen der wechselnden Befallsintensität zulassen.

Herrn Prof. Dr. R. HARDER verdanke ich die Anregung zu den Versuchen. Für sein Interesse an der Arbeit und die fördernde Kritik danke ich herzlich.

Literaturverzeichnis.

ARTHUR, J. M., J. D. GUTHRIE and J. M. NEWELL: The effects of artificial climates on the growth and chemical composition of plants. *Amer. J. Bot.* **17**, 416 (1930).

BARRENSCHEEN, H. K., J. PANY u. E. SRB: Synthetische Leistungen des Keimlings. II. Mitt.: Zur Frage der Bildung des Chlorophylls in etiolierten Weizenkeimlingen. *Biochem. Z.* **310**, 335 (1942). — BAWDEN, F. C., and F. M. ROBERTS: The influence of light intensity on the susceptibility of plants to certain viruses. *Ann. Appl. Biol.* **34**, 286 (1947); Photosynthesis and predisposition of plants to infection with certain viruses. *Ann. Appl. Biol.* **35**, 418 (1948). — BEVER, W. M.: Effect of light on the development of the uredial stage of *Puccinia glumarum*. *Phytopath.* **24**, 507 (1934). — BONNIER, G.: Influence de la lumière électrique continue sur la forme et la structure des plantes. *Rev. Gén. Bot.* **7**, 289 (1895).

CAJLACHJAN, M. CH.: Pseudo-immunity in plants. *C. R. Ac. Sci. URSS* **56**, 99 (1947). — CAJLACHJAN, M. CH., and V. A. ALEXANDROVSKAJA: On the nature of photoperiodic after-effect and on the effect of the length of day on the activity of the oxydising enzymes. *C. R. Ac. Sci. URSS* **2**, 164 (1935). — CHEREWICK J. W.: Studies on the biology of *Erysiphe graminis* DC. *Can. J. Res. Sect. C* **22**, 52 (1944). — CHILDS, J. F. L.: Diurnal cycle of spore maturation in certain powdery mildews. *Phytopath.* **30**, 65 (1940). — CORNER, E. J. H.: Observations on resistance to powdery mildews. *New Phytol.* **34**, 65 (1935).

DENFFER, D. v.: Über das Zusammenwirken von Keimstimmung und täglicher Belichtungsdauer auf die Entwicklung von *Sinapis* und *Hordeum*. *Jb. wiss. Bot.* **88**, 759 (1939). — DUFF, G. H., and D. F. FORWARD: Physiological and biochemical studies in plant metabolism. I. The respiration of the seedling wheat leaf in starvation and ontogeny. *Can. J. Res. Sect. C* **27**, 125 (1949).

FOSTER, R. E., and J. C. WALKER: Predisposition of tomato to *Fusarium* wilt. *J. Agr. Res.* **74**, 165 (1947).

GALLEGLY, M. E., and J. C. WALKER: Plant nutrition in relation to disease development. Amer. J. Bot. **36**, 613 (1949); Relation of environmental factors to bacterial wilt of tomato. Phytopath. **39**, 936 (1949). — GARNER, W. W., and H. A. ALLARD: Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction of plants. J. Agr. Res. **18**, 553 (1920). — GASSNER, G., u. G. O. APPEL: Untersuchungen über die Infektionsbedingungen der Getreiderostpilze. Arb. Biol. Reichsanst. **15**, 417 (1927). — GASSNER, G., u. G. GOEZE: Assimilationsverhalten, Chlorophyllgehalt und Transpirationsgröße von Getreideblättern mit besonderer Berücksichtigung der Kalium- und Stickstoffernährung. Z. f. Bot. **27**, 257 (1934). — GAUMANN, E.: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl. Basel 1951. — GOTTLIEB, D., and H. HART: Growth substances and the rust fungi. Phytopath. **33**, 724 (1943). — GRAINGER, J.: The ecology of Erysiphe graminis DC. Trans. Brit. Mycol. Soc. **31**, 54 (1947). — GRECHUSHNIKOV, A. J.: Rôle of peroxidase in immunity against Phytophthora infestans de Bary. C. R. Ac. Sci. URSS **25**, 683 (1939); Variation of cystoamylase in potato due to different conditions of growing. C. R. Ac. Sci. URSS **25**, 688 (1939). — GYÖRGY, P.: Vitamin methods, Bd. I, New York 1951.

HAMMARLUND, C.: Zur Genetik, Biologie und Physiologie einiger Erysiphaceen. Hereditas **6**, 1 (1925). — HARDER, R., I. FABIAN u. D. v. DENFFER: Lichtintensität und Photoperiodismus. Züchter **9**, 41 (1937). — HASSEBRAUK, K.: Untersuchungen über den Einfluß einiger Außenfaktoren auf das Anfälligkeitsverhalten der Standardsorten gegenüber verschiedenen physiologischen Rassen des Weizenbraunrostes. Phytopath. Z. **12**, 233 (1940a); Zur Frage der Wirkung von Außenfaktoren auf verschiedene Stadien von Weizenbraunrost. Phytopath. Z. **12**, 490 (1940b); Untersuchungen über die Einwirkung von Sulfonamiden und Sulfonen auf Getreideroste. I. Die Beeinflussung des Fruktifikationsvermögens. Phytopath. Z. **17**, 384 (1950/51). — HEY, G. L., and J. E. CARTER: The effect of ultra-violet radiations on the vegetative growth of wheat seedlings and their infection by Erysiphe graminis. Phytopath. **21**, 694 (1931). — HONECKER, L.: Über die Modifizierbarkeit des Befalls und das Auftreten verschiedener physiologischer Formen beim Mehltau der Gerste, Erysiphe graminis hordei Marchal. Z. f. Züchtg. **19**, 577 (1934); Die Bestimmung der physiologischen Rassen des Gerstenmehltaus (Erysiphe graminis hordei Marchal). Phytopath. Z. **10**, 197 (1937). — HURD-KARRER, A. M., and A. D. DICKSON: Carbohydrate and nitrogen relations in wheat plants with reference to type of growth under different environmental conditions. Plant Physiol. **9**, 533 (1934).

JOHNSON, T., and M. NEWTON: The influence of light and certain other environmental factors on mature plant resistance of Hope wheat to stem rust. Can. J. Res. Sect. C **18**, 357 (1940). — JOHNSTON, C. O., and E. C. MILLER: Modification of diurnal transpiration in wheat by infections of Puccinia triticina. J. Agr. Res. **61**, 427 (1940).

KAMMERMANN, N.: Undersökningar rörande potatisbladmöglet Phytophthora infestans (Mont.) de By. II. Sambandet mellan potatis bladsaftens peroxidasaktivitet och phytophthoraresistensen. Statens växtskyddsanstalt Meddel. **58** (1951). — KOLLER, S.: Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen. 2. Aufl. Dresden und Leipzig 1943. — KÜDERLING, O.-E.: Untersuchungen über die Feldresistenz einzelner Weizensorten gegen Puccinia glumarum tritici. Ztschr. f. Züchtg. **21**, 1 (1936).

LING, L.: Factors affecting infection in rye smut and subsequent development of the fungi in the host. Phytopath. **31**, 617 (1941).

McKEE, H. S.: Studies on the nitrogen metabolism of the barley plant (Hordeum sativum). Austral. J. Sci. Res. **3**, 474 (1950). — McKINNEY, H. H.: Mosaic diseases

of wheats and related cereals. U. S. Dept. Agr. Cir. **442** (1937). — MOSHKOV, B. S.: Photoperiodism and immunity. C. R. Ac. Sci. URSS **19**, 751 (1938).

NEGER, F. W.: Beiträge zur Biologie der Erysipheen. Flora **90**, 221 (1902).

PÄTAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (Eine neue t-Tafel). Biol. Zbl. **63**, 152 (1943). — PIRSCHLE, K., u. F. v. WETTSTEIN: Einige vorläufige Beobachtungen über die Wirkung verschiedener Lichtintensitäten und -qualitäten auf höhere Pflanzen unter konstanten Bedingungen. Biol. Zbl. **60**, 626 (1940). — POHJAKALLIO, O.: Über das Auftreten von Brand bei Hafer unter verschiedenen Belichtungsverhältnissen (finnisch). Maataloustieteellinen Aikakauskirja **24**, 24 (1952). — POHJAKALLIO, O., L. OLLILA and K. PAASI: Investigations into the significance of photosynthesis in resistance to plant diseases. J. Sci. Agr. Soc. Finland **23**, 156 (1951). — POUND, G. S., and P. C. CHEO: Studies on resistance to cucumber virus 1 in spinach. Phytopath. **42**, 301 (1952). — PRATT, R.: Influence of temperature on the infection of wheat by powdery mildew, Erysiphe graminis tritici. Bull. Torr. Bot. Cl. **70**, 378 (1943); Influence of light on the infection of wheat by the powdery mildew, Erysiphe graminis tritici. Bull. Torr. Bot. Cl. **71**, 134 (1944). — PRYOR, D. E.: The influence of vitamin B₁ on the development of cantaloupe powdery mildew. Phytopath. **32**, 885 (1942).

RASUMOV, V. J.: Über die photoperiodische Nachwirkung im Zusammenhang mit der Wirkung verschiedener Aussaattermine auf die Pflanzen. Planta **10**, 345 (1930). — REED, G. M.: Influence of light on infection of certain hosts by powdery mildews. Science **39**, 294 (1914); Influence of the growth of the host on oat smut development. Proc. Amer. Philos. Soc. **79**, 303 (1938). — RODENHISER, H. A., and J. W. TAYLOR: Studies on environmental factors affecting the infection and the development of bunt in wheat. Phytopath. **30**, 20 (1940); The effect of photoperiodism on the development of bunt in two spring wheats. Phytopath. **33**, 240 (1943). — ROEMER, TH., W. H. FUCHS u. K. ISENBECK: Die Züchtung resistenter Rassen der Kulturpflanzen. Berlin 1938.

SCHWARTZ, D., et J. CUZIN: Influence du facteur lumière sur le temps d'incubation de la mosaïque du tabac. Ann. Inst. Pasteur **79**, 178 (1950). — SCHWARTZ, D., J. CUZIN et A. RENNIER: Influence des conditions d'éclairement du semis sur le taux de mosaïques dans une culture en plain champ. Ref.: Biol. Abstr. **26**, 13293 (1952). — SEMPIO, C.: Influenza della luce e dell'oscurità sui principali periodi del parassitamento. Riv. Patol. Veget. **29**, 1 (1939); Influenza della luce continua sulla resistenza del frumento all'Erysiphe graminis e meccanismo di tale resistenza. Riv. Biol. **35**, (1943a); Influenza dell'oscurità sulla respirazione e sulla glikolisi di alcune piante in rapporto alla loro resistenza a parassiti obbligati. Riv. Biol. **35**, (1943b); Métabolisme du „Complexe“ froment-Erysiphe graminis; Internat. Bull. Pl. Protect. **20**, 49 (1946). — SILL, W. H., and J. C. WALKER: Cowpea as an assay host for cucumber Virus 1. Phytopath. **42**, 328 (1952).

TAPKE, V. F.: Influence of preinoculation environment on the infection of barley and wheat by powdery mildew. Phytopath. **41**, 622 (1951). — THOMAS, H. E.: The relation of the health of the host and other factors to infection of Apium graveolens by Septoria Apii. Bull. Torrey Bot. Club **48**, 1 (1921). — TRELEASE, S. F., and H. M. TRELEASE: Susceptibility of wheat to mildew as influenced by carbohydrate supply. Bull. Torr. Bot. Club **56**, 65 (1929).

VOLK, A.: Einflüsse des Bodens, der Luft und des Lichtes auf die Empfänglichkeit der Pflanzen für Krankheiten. Phytopath. Z. **3**, 1 (1931).

WEBER, E.: Grundriß der biologischen Statistik für Naturwissenschaftler und Mediziner. Jena 1948. — WESTON, W. H.: Production and dispersal of conidia in Philippine Sclerosporas of maize. J. Agr. Res. **23**, 239 (1923); Nocturnal production of conidia by Sclerospora graminicola. J. Agr. Res. **27**, 771 (1924). — WITHROW,

A. P., and R. B. WITHROW: Photoperiodic chlorosis in tomato. *Plant Physiol.* **24**, 657 (1949).

YARWOOD, C. E.: The diurnal cycle of the powdery mildew *Erysiphe polygoni*. *J. Agr. Res.* **52**, 645 (1936); Diurnal cycle of ascus maturation of *Taphrina deformans*. *Amer. J. Bot.* **28**, 355 (1941); Some relations of carbohydrate level of the host to plant virus infections. *Amer. J. Bot.* **39**, 124 (1952). — YARWOOD, C. E., and M. COHEN: Diurnal responsiveness of *Erysiphe graminis* to nutrients. *Science* **110**, 477 (1949). — YEMM, E. W.: Respiration of barley plants. IV. Protein catabolism and the formation of amides in starving leaves. *Proc. Roy. Soc. B.* **136**, 632 (1950).

ZAKHAROV, B. S.: Der Einfluß der Tageslänge auf den Befall der Sonnenblume durch *Orobancha cumana*. *C. R. Ac. Sci. URSS* **27**, 267 (1940); Influence of daylength on susceptibility of sunflower to affection with broom-rape. *C. R. Ac. URSS* **32**, 446 (1941).

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen.)

Über die antagonistische Beeinflussung von Wachstum und Atmung bei einigen höheren Pilzen*.

Von

GEORG NESEMANN.

Mit 11 Textabbildungen.

(Eingegangen am 26. Juni 1953.)

Seit HARDER (1911) seine Untersuchungen über das Verhalten von Pilzen in Mischkulturen veröffentlichte, ist, besonders durch die Entdeckung des Penicillins angeregt, eine große Anzahl holzzerstörender Basidiomyceten auf die Bildung antibiotischer Stoffe untersucht worden (WILKINS u. HARRIS 1944; WILKINS 1945, 1946, 1947 a, b, c, 1948; KAVANAGH 1947; ROBBINS u. KAVANAGH 1947; MELIN 1947; WILKINS u. REES 1950; KAVANAGH, HERVEY u. ROBBINS 1951; BOSE 1953 u. a.). Doch haben sich nur wenige Arbeiten mit der Bedeutung der antibiotischen Stoffe für die Pilze selbst befaßt (ZELLER u. SCHMITZ 1919; SCHMITZ, H. 1925; BOTHE 1928). Dieses Problem hat OPPERMANN (1951) in vollem Umfang wieder aufgegriffen und nicht nur das Verhalten einer größeren Anzahl höherer Pilze zueinander untersucht, sondern auch die Voraussetzungen zur Bildung antibiotischer Stoffe bei ihnen sowie deren Bedeutung auf natürlichem Substrat gezeigt. Es ist jedoch nur wenig über die physiologischen Vorgänge, die z. B. bei der Hemmung in Mischkultur zwischen 2 Pilzmycelien ablaufen, bekannt, wenn auch Antagonisten einzelner Stoffwechselvorgänge untersucht worden sind (PERLMAN 1948; FRIES u. PANDERS 1950; MANDELS u. SIU 1950 u. a.) und viele Untersuchungen der letzten Jahre sich mit der physiologischen Wirkung der drei wichtigsten antibakteriellen Stoffe Penicillin, Streptomycin und den Sulfonamiden befassen (TSCHECHE 1947; PRATT u. DUFRENOY 1947; BERKMAN, HENRY, HOUSEWRIGHT u. HENRY 1947; RYBAK u. GROS 1948; AUHAGEN 1948; NIMMO-SMITH 1948; GEORGE u. PANDALEI 1949 u. a.).

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, die antibiotischen Beziehungen zwischen Eumyceten weiter zu klären. Vor allem wird die Wirkung durch Zersetzung und Stoffwechselprodukte veränderter Nährlösung von Pilzkulturen auf Wachstum und Atmung einiger anderer Basidiomyceten untersucht und die durch letztere wiederum veränderte antibiotische Aktivität der geprüften Lösungen.

I. Material und Methodik.

Als Pilze, deren antibiotische Stoffwechselprodukte untersucht werden sollten, wurden 6 Basidiomyceten und 1 Ascomycet ausgesucht, die sich nach den Untersuchungen von OPPERMANN (1951) als antibiotisch besonders aktiv erwiesen hatten. Es waren dies die Basidiomyceten (der Einfachheit halber werden im weiteren Text nur die Gattungsnamen verwendet) *Merulius lacrymans*, *Polyporus sulfureus*,

* Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen.

Daedalea quercina, *Pholiota mutabilis*, *Panus conchatus*, *Lepiota cepaestipes* und der Ascomycet *Xylaria polymorpha*. Die Pilze, an denen die Wirkung der Stoffwechselprodukte untersucht werden sollte, mußten sich dagegen durch schnelles, gleichmäßiges Wachstum sowie keine oder nur geringe eigene antibiotische Aktivität auszeichnen. Das war der Fall bei den Basidiomyceten *Coniophora cerebella* (Stamm Liese, C 57), *Polystictus versicolor*, *Fomes fomentarius*, *Trametes radiciperda* (P 14) und *Schizophyllum commune*. *Coniophora* und *Trametes* stammten aus der Sammlung des Forstbotanischen Institutes in Hann. Münden, *Polystictus* wurde aus Sporen gezogen und zum Paarkernmycel kombiniert, *Fomes* wurde im Herbst 1950 aus dem Mycel eines Fruchtkörpers isoliert. Die anderen Stämme waren in der Sammlung des Göttinger Institutes vorhanden; sie waren im Herbst 1949 aus Fruchtkörpern isoliert worden. In ergänzenden Versuchen wurden noch *Penicillium* spec. und *Saccharomyces* spec. verwendet. Beide waren aus Luftinfektionen auf Agarplatten selbst isoliert. Aus der Sammlung des Institutes stammten auch Stämme von *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Bacterium prodigiosum*, *Bacillus subtilis* und *Bacillus mycoides*. Alle Stammkulturen wurden in Schrägröhrchen gehalten und alle 4 Wochen überimpft.

1. Die Gewinnung hemmstoffhaltiger Lösungen.

Die Pilze, deren antibiotische Stoffwechselprodukte untersucht werden sollten, wurden in ERLÉNMEYER-Kolben (300 cm³) auf je 70 cm³ 3,5% iger Biomalzlösung gezogen. Jeder Kolben wurde, um ein möglichst gleichaltes Mycel zu erhalten, mit 3—4 Mycelstücken beimpft. Die Kulturen wurden bei schwachem diffusen Licht und etwa 23° C aufgestellt. Nach Ablauf der Kulturzeit wurde die gebrauchte Nährlösung durch ein Sieb abgesehen, im Vakuum bei 30° C (um empfindliche Stoffe nicht zu zerstören) so konzentriert, daß ihr Trockensubstanzgehalt dem einer 7%igen Malzlösung entsprach¹ und dann durch ein Membranfilter Nr. 10 steril filtriert. Von jeder Lösung wurden 3 verschiedene Konzentrationen (meist 100, 60 und 20%) durch Verdünnung mit steriler 7% iger Biomalzlösung hergestellt. Da das Einengungsverhältnis 3—3,5:1 war und die Verdünnung bei Zugabe zum Testpilz 3 bzw. 2:5 betrug, lag die ursprüngliche Konzentration immer im Untersuchungsbereich. Die Verarbeitung der gebrauchten Lösungen erfolgte so, daß sie erst unmittelbar vor ihrer Verwendung im Versuch fertiggestellt wurden. (Diese Lösungen werden nachstehend „gebrauchte Nährlösung“, „Hemmlösung“ oder ähnlich genannt; meist werden sie aber einfach als „Lösungen“ mit dem hinzugesetzten Namen des Pilzes, der auf ihnen gewachsen war, bezeichnet; z. B. „*Merulius*-Lösung“ ist also die aus einer *Merulius*-Kultur stammende Nährlösung.)

2. Die Messung der durch die Testpilze gebildeten Atmungskohlensäure

Da die Atmung der Pilze über längere Zeit verfolgt werden sollte, wurde nicht mit einer WARBURG-Apparatur gearbeitet, sondern die in den Kulturgefäßen durch die Atmung der Pilze entstandene Kohlensäure wurde in Abständen von 12 Std (das erstmal 24 Std nach Beimpfung) durch Durchleiten von je 5 Litern Luft herausgespült. Diese Luft war vorher durch Passieren zweier Türme mit granuliertem KOH und einer Waschflasche mit KOH-Lösung CO₂-frei gemacht worden, zum Anwärmen im Thermostaten durch eine 2 m lange dünne, in einem Wasserbad liegende spiralförmige Kupferröhre und zum Erreichen der notwendigen hohen Luftfeuchtigkeit (über 95% nach BAVENDAMM u. REICHEL 1938 und THEDEN 1941) durch eine Waschflasche mit Aq. bidest. geleitet worden. Über eine Verteilungs-

¹ Die Trockensubstanz des Biomalz besteht zu 96% aus Kohlenhydraten und hat sich in den Versuchen als Maß des Nährwertes gut bewährt.

anlage wurde sie zu den Kulturen (Durchströmungsgeschwindigkeit: 0,2 Liter/min) und von dort direkt wieder aus dem Thermostaten geleitet. Die Messung der CO_2 -Mengen erfolgte konduktometrisch (FRIEDMANN 1933; JANDER u. PFUND 1934; BEILER u. SCHWARZ 1937; FELDBACH 1939; J. SCHMITZ 1951 u. a.). Die Anordnung war die gleiche wie bei SCHMITZ: Absorption der Kohlensäure in $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung und Messung der sich dadurch ändernden Leitfähigkeit der Lauge mit Hilfe der WHEATSTONSchen Brückenschaltung. Zur Nulleinstellung der Brücke wurde anfangs ein Kopfhörer, später ein „magisches Auge“ verwendet, das durch einen Transformator und eine Verstärkerröhre hochempfindlich gemacht war.

Zu jedem Atmungsversuch wurden 16 Kulturen verwendet (je 4 für die zu prüfenden 3 Konzentrationen der Lösungen und die Kontrolle). Die Luftleitungen waren so geschaltet, daß immer 4 Kulturen zugleich durchströmt werden konnten.

3. Die Kultur der Testpilze.

Die Wirkung der Hemmstoffe sollte auf die gebildete Mycelmenge, die Ausbreitung des Mycels (in der Literatur meist als Wachstumsgeschwindigkeit bezeichnet) und die CO_2 -Atmung in gleichmäßigem Wachstum befindlicher Pilze gleichzeitig gemessen werden¹. Die Pilze wuchsen deshalb auf flüssigem Substrat als Oberflächenkultur. Bei Einimpfung in der Mitte kann man dabei sowohl die Zunahme des Koloniedurchmessers als auch das Mycelgewicht bestimmen, und das Wachstum ist fast unabhängig von der Lösung der Gase in der Nährlösung (siehe PERLMAN 1949). Von Nachteil ist, daß Luftmycel und submerses Mycel sich physiologisch verschieden verhalten können (KLUYVER u. PERQUIN 1933; DARBY u. GODDARD 1950).

In sterile ERLNMEYER-Kolben (300 cm^3) wurden je 50 cm^3 7%iger Biomalz-lösung gefüllt, die im Autoklaven sterilisiert worden war. Die Kolben wurden mit 3fach durchbrochenen Stopfen aus rotem Gummi², durch die 3 Glasrohre führten, luftdicht verschlossen. 2 der Glasrohre dienten zum Ein- und Ableiten der Luft für die Atmungsuntersuchung. Das dritte war unten auf 2—3 mm Stärke ausgezogen und reichte in der Mitte des Kolbens bis unmittelbar über den Boden; es diente sowohl zur Zuführung der zu prüfenden Lösungen, die in geeigneter Weise steril eingeleitet wurden, als auch zum Halten des darauf gespießten Impfstückes. Die Impfstücke wurden am Rande von Agarplatten (20 cm^3 Malzagar in PETRI-Schalen), die genau in der Mitte mit einem Mycelstück des Testpilzes geimpft worden waren, nach Bewuchs der Oberfläche (je nach Art in 5—7 Tagen) mit einem Korkbohrer von 13 mm Durchmesser ausgestochen. Sofort nach dem Beimpfen wurden die Kulturen in den Thermostaten gestellt (Temperatur $25 \pm 0,25^\circ\text{C}$), die Luftleitungen angeschlossen und die Luftdichtigkeit kontrolliert. 36 Std nach dem Beimpfen, unmittelbar nach der 2. Atmungsmessung, wurden den Kulturen 30 cm^3 der zu prüfenden Lösungen (in einigen Fällen nur 20) mit einer geeigneten Vorrichtung steril zugesetzt (in den Kontrollen 7%ige Biomalzlösung), nachdem zuvor die entsprechende Menge Nährlösung abgesaugt worden war³. Die Kulturen

¹ Die Empfindlichkeit gegen Antibiotica kann in den einzelnen Entwicklungsabschnitten einer Kultur sehr verschieden sein (z. B. TAMIYA, Vortrag auf dem 7. Internationalen Botaniker-Kongreß in Stockholm 1950).

² Schwarze Gummistopfen hatten sich als giftig erwiesen (siehe auch MYERS u. CLARK 1944).

³ Versuche mit Methylenblaulösungen ergaben, daß durch mehrfaches Ansaugen und Einfließen eine gleichmäßige Durchmischung der gesamten Nährlösung stattfand. In Kontrollversuchen ließ sich keinerlei Störung von Wachstum oder Atmung durch diese Manipulation feststellen.

von *Schizophyllum* wurden 24 Std nach Zusatz der Lösungen abgeerntet, da durch das intensive Wachstum sonst die Kapazität der Apparatur überschritten worden wäre, die der anderen Pilze 48 Std nach Zusatz. Die Kolben wurden sofort nach Herausnahme aus dem Thermostaten auf Millimeterpapier gestellt, der Durchmesser des Mycel in 4 verschiedenen Richtungen gemessen und darauf nach mehrfachem Waschen mit Aq. dest. das Trockengewicht des Mycels bestimmt. Nach Messung der p_H -Werte mit Merck-Indikatorpapier, wurden die Nährlösungen der 4 Kolben jeder Konzentrationsreihe zusammengegossen und zur Bestimmung des restlichen Hemmstoffgehaltes im Lochtest 10 cm³ entnommen.

In Untersuchungen, die nur der Wachstumsmessung dienten, war die Kultur grundsätzlich die gleiche wie vorstehend, nur die Durchlüftung entfiel.

4. Bestimmung der Hemmstoffkonzentration im Lochtest.

Bei Anwendung des Lochtestes (FLEMMING 1946; WILKINS 1949; OPPERMANN 1951 u. a.) zur Messung der Hemmstoffkonzentrationen wurden PETRI-Schalen mit ebenem Boden mit 20 cm³ Nähragar (5% Malzextr., 1,8% Fadenagar) gefüllt und in der Mitte mit einem Mycelstück von *Polystictus* beimpft¹. Nach 48 Std bei 25° C betrug der Myceldurchmesser etwa 3 cm; nun wurde der Mycelrand mit Tiñte auf die Unterseite der Schale gezeichnet. 1 cm vor dem Rand wurde in den Agar ein Loch von 9 mm Durchmesser gestanzt und dieses mit 0,2 cm³ der zu prüfenden Lösung gefüllt. Nach 24 Std betrug der Neuzuwachs auf dem freien Agar etwa 11 mm; gegen das Loch war er, wenn die eingefüllte Flüssigkeit hemmend wirkte, geringer.

Das Verhältnis $\frac{\text{Zuwachs in Richtung auf das Loch}}{\text{Zuwachs auf freiem Agar}} \cdot 100$ (gemessen nach 24 Std) wurde als Maß der Hemmung benutzt und mit OPPERMANN (1951) als „antibiotischer Quotient“ (AQ) bezeichnet.

Der antibiotische Quotient ist jedoch nicht der Konzentration der Hemmstoffe proportional. Bestimmt man die antibiotischen Quotienten für verschiedene Verdünnungsgrade einer Merulius-Lösung, so ergeben sich z. B. für *Merulius*-Lösung die Werte in Tab. 1.

Tabelle 1. *Mycelzuwachs von Polystictus und Bestimmung des AQ gegen 4 Verdünnungsgrade einer Merulius-Nährlösung im Lochtest (4 Parallelkulturen).*

Konzentration:	100%	80%	60%	40%
Verhältnis des Zuwachses in Richtung auf das Loch zum Zuwachs auf freiem Agar in mm:	6 : 11	6,5 : 11	7,5 : 10,5	8 : 11
	6 : 11	6,5 : 11	7 : 11	8 : 11
	6 : 10,5	6,5 : 11	7,5 : 11	8 : 11
	6,5 : 11	7 : 11	7,5 : 11	8 : 10,5
Summe:	24,5 : 43,5	26,5 : 43,5	29,0 : 43,5	32,0 : 43,5
Antibiotischer Quotient:	56	61	67	74

Um zu einem absoluten Maß der Hemmstoffkonzentration zu gelangen, wurde die Hemmstoffmenge, die unter den oben geschilderten

¹ Dieser Pilz ermöglicht bei der scharfen Begrenzung seines Mycelrandes genaue Ablesung des Wachstums und ist nach OPPERMANN (1951) gegen die zu prüfenden Hemmstoffe empfindlich.

Bedingungen im Lochtest einen antibiotischen Quotienten von 56 ergab, gleich 20 Einheiten gesetzt, was einer Konzentration von 100 Einheiten je Kubikzentimeter (E/cm^3) entspricht (siehe auch FLEMMING 1946).

Wählt man für die Hemmstoffe der übrigen untersuchten Lösungen den gleichen Bezugspunkt ($AQ\ 56 = 20\ E$), so ergeben sich bei der Verdünnung gleichlaufende Kurven, wie es in Abb. 1 auch von *Daedalea*- und *Xylaria*-Lösung dargestellt ist. Alle Hemmstoffmengen wurden darum mit Hilfe der Kurve in Abb. 1 bestimmt; doch ist den verschiedenen Hemmstoffen bei gleicher Anzahl von Einheiten nur gemeinsam, daß sie im Lochtest den gleichen AQ ergaben.

Von jeder zu messenden Konzentration wurden 4 PETRI-Schalen angesetzt und daraus der Mittelwert genommen (Beispiel Tab. 1). Trotzdem muß man mit einem Fehler bis $\pm 10\%$ rechnen (FLEMMING 1946 gibt 15–20% an). Da die Ablesegenauigkeit im Bereich eines antibiotischen Quotienten von 90–60 am größten ist, wurden in den Versuchen so weit als möglich die Konzentrationen durch Einengen oder Verdünnen auf diesen Bereich eingestellt und dann die Ausgangskonzentration berechnet.

Im pH -Bereich 2,0–5,6 wirkte eine mit HCl oder Oxalsäure versetzte 5%ige Malzlösung nicht hemmend, daher wurden sehr saure Lösungen mit KOH auf $pH\ 2,5$ gepuffert. Lösungen mit $pH > 5,6$ lagen nicht vor (siehe aber S. 341).

Hemmung durch Änderung des osmotischen Wertes traten erst auf, wenn die zu prüfenden Lösungen über 40% Malzextrakt enthielten.

Außer wachstumshemmenden Stoffen lassen sich bei Verwendung geeigneter Indikatoren auch andere Substanzen im Lochtest nachweisen. So lassen sich durch heterotrophe Mikroorganismen Vitaminkonzentrationen bestimmen (HARRISON, LEES u. WOOD 1951; PRICE 1948). Dabei ist der Radius der Wachstumszone proportional dem Logarithmus der Konzentration (PRICE 1948). Setzt man 0,2% $Ca(HCO_3)_2$ zum Agar, so läßt sich in gleicher Weise durch den gebildeten Trübungshof die Konzentration von Säuren, besonders der Gehalt an freier Oxalsäure, messen, wenn ihre Ca -Salze unlöslich sind. Enzymkonzentrationen lassen sich durch Farbstoffindikatoren bestimmen (BAVENDAMM 1928, 1939; OPPERMANN 1951). Dabei ist es zweckmäßig in die Löcher ausgestanzte Mycelstücke zu setzen.

Alle diese Methoden wurden verwendet.

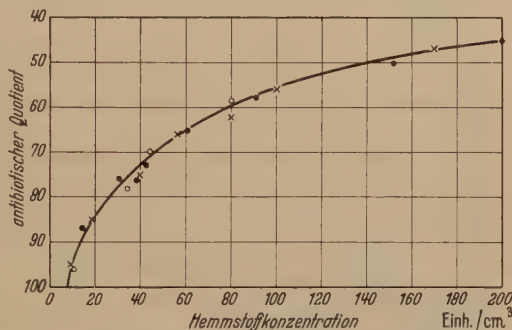


Abb. 1. Werte der antibiotischen Quotienten bei verschiedenen Konzentrationen von *Merulius*- (x), *Daedalea*- (o) Lösungen.

II. Vorversuche.

1. Zeitliches Auftreten der Hemmstoffe in der Nährlösung.

Mehreren Autoren zufolge werden Hemmstoffe nur in bestimmtem Alter der Kultur in größerer Menge angereichert (COOK u. LACEY 1945; BOSE 1947 u. 1953; DULANEY, HODGES u. PERLMAN 1947; LULLA 1949; OPPERMANN 1951 u. a.), da sie nur von bestimmten Bezirken des Mycels gebildet werden (WHINFIELD 1949). Um zu einer maximalen Hemm-

stoffausbeute zu gelangen, wurde darum die Änderung der Konzentration im Verlaufe der Kultur verfolgt.

Von jedem zu untersuchenden Pilz wurden 4 gleiche Kulturen angesetzt. Sie wurden im Thermostaten bei 25° C gehalten, *Merulius* bei 20°. In regelmäßigen Abständen wurden aus allen 4 einige Kubikzentimeter entnommen, gemischt, davon 10 cm³ auf 2—3 eingengt und die Hemmstoffkonzentration im Lochtest bestimmt.

Ihrem Verhalten nach lassen sich 3 Gruppen unterscheiden (Abb. 2).

1. In der Kulturlösung von *Merulius* und *Daedalea* wurde der Hemmstoff im Laufe des Wachstums angereichert und die nach 2—3 Wochen erreichte Maximal-Konzentration über lange Zeit beibehalten¹.

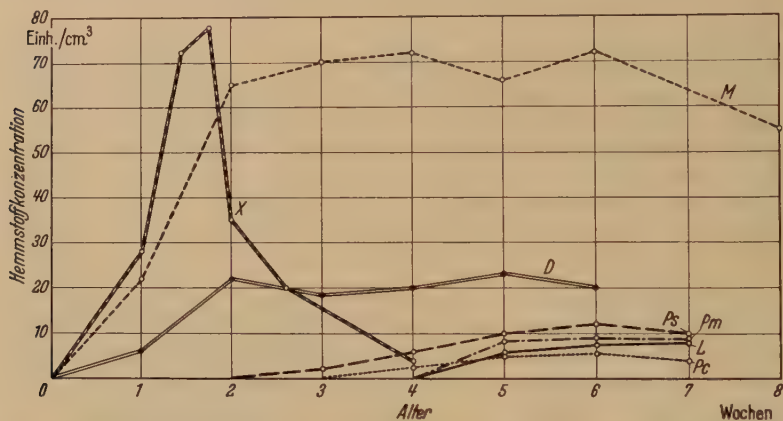


Abb. 2. Änderung der Hemmstoffkonzentrationen (in E/cm³) mit dem Alter (in Wochen) in Kulturen von *Merulius* (M), *Daedalea* (D), *Xylaria* (X), *Panus* (Pc), *Polyporus* (Ps), *Pholiota* (Pm) und *Lepiota* (L).

2. Bei *Xylaria* wurde der Hemmstoff sehr schnell angereichert; er erreichte nach 11—12 Tagen seine höchste Konzentration. Die Oberfläche der Nährlösung war dann zu etwa 4/5 mit Mycel bedeckt. Nach völligem Bewuchs der Oberfläche fiel die Konzentration sofort stark ab, und nach 3—4 Wochen war fast kein gegen Pilze wirksamer Hemmstoff mehr vorhanden².

3. *Panus*, *Pholiota*, *Polyporus* und *Lepiota*: Der Hemmstoff reicherte sich erst nach Ende der Hauptwachstumsphase an und verschwand später z. T. wieder. Das Maximum der Konzentration lag bei ungefähr 5 Wochen.

¹ Es braucht sich jedoch nicht um einen einheitlichen Hemmstoff zu handeln oder bei Vorliegen eines Gemisches das Verhältnis das gleiche zu bleiben (COOK u. LACEY 1945).

² Das nur kurzfristige Auftreten eines Hemmstoffes bei *Xylaria* vermag vielleicht auch das unterschiedliche Verhalten in Mischkultur und Lochtest bei OPPERMAN (1951) zu erklären, da dort im Lochtest Lösungen 4 Wochen alter Kulturen verwendet wurden.

Die Kulturdauer bis zur Verwendung der Nährlösungen im Versuch betrug auf Grund der vorstehenden Versuche bei *Xylaria* 12 Tage, bei *Merulius* und *Daedalea* 3 Wochen und bei *Panus*, *Pholiota*, *Polyporus* und *Lepiota* 5 Wochen.

2. Fehlerquellen und Fehlerbreite der Atmungsmessungen.

Vor Beginn der Hauptversuche wurden die Fehlerquellen der Atmungsmeßapparat überprüft.

1. Ablesefehler: Die Ablesung auf der Walzenbrücke war auf ± 1 Skalenteil genau; das entspricht einem maximalen Fehler von 0,08 mg CO₂.

2. Durchlüftungsfehler: Im Blindversuch wurde in den Kolben CO₂ entwickelt und nach normaler Messung weitere 25 Liter Luft durchgeleitet und erneut gemessen. Die 2. Luftmenge war niemals gänzlich CO₂-frei, enthielt aber nie mehr als 3,37% (im günstigen Falle 2,16%) der Gesamtkohlensäuremenge. Mittelwert dieses Fehlers aus Messungen mit 8fach variiertem CO₂-Menge war 2,52%.

3. Hemmung des Wachstums oder der Atmung durch die bei der Messung durchströmende Luft oder durch die zwischen 2 Messungen sich anreichernde Kohlensäure (die größte CO₂-Menge in 12 Std wurde bei *Schizophyllum* mit 30 mg = 5 Vol% gemessen, bei den anderen Pilzen war sie bedeutend niedriger) war nicht festzustellen, denn Versuche mit *Coniophora* und *Polystictus* ergaben keine Unterschiede im Wachstum und der CO₂-Entwicklung zwischen Kulturen mit kontinuierlicher Durchlüftung (8 Liter/12 Std) und Durchlüftung im Abstand von 12 Std.

4. Durch Verschiedenheiten beim Impfen und andere Gründe war die Entwicklung in den einzelnen Kulturen und damit auch die Atmung niemals ganz gleich. Um die dadurch entstehende Fehlerbreite zu ermitteln, wurde ein 84 Std dauernder Kontrollversuch mit 16 Kulturen von *Polystictus* durchgeführt (dabei Zusatz frischer Nährlösung statt zersetzter). Die Abweichungen der einzelnen Werte hielten sich innerhalb $\pm 6\%$ mit Ausnahme eines Falles, wo sie $+8\%$ betrug. Die 16 Kulturen standen in der üblichen Anordnung im Thermostaten. Ein Zusammenhang zwischen Fehlergröße und Verteilung der Kulturen im Thermostaten ergab sich dabei nicht.

3. Normale Entwicklung der Testpilze und Einfluß der Nährlösungskonzentration.

An dieser Stelle sei auch ein kurzer Überblick über die wesentlichsten physiologischen Daten der Testpilze gegeben.

Vergleicht man Wachstum und Atmung von *Polystictus* und *Coniophora* mit den trotz verschiedener Methoden ziemlich übereinstimmenden Ergebnissen von Wachstums- und Atmungsuntersuchungen an mycelbildenden Pilzen in der Literatur (z. B. DE BOER 1929; TAMIYA u. YAMAGUTCHI 1933; YAMAMOTO 1933; SCHEFFER 1936 u. 1937; ZYCHA 1937; SMITH 1949a; DARBY u. GODDARD 1950; WIKÉN u. SOMM 1952), so ergibt sich folgender Entwicklungsablauf: Die Inkubationszeit (Zeit bis zum ersten sichtbaren Wachstum) dauerte 8—10 Std. Die in der angelsächsischen Literatur als „initial lag“ oder „lag“ bezeichnete Periode des Anwachsens war 14—15 Std nach Beimpfen beendet. Von da an war die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Mycels (Zunahme des Koloniedurchmessers) konstant (Abb. 3, e). In der anschließenden, der logarith-

mischen Phase der Einzeller entsprechenden Periode, folgt nach EMERSON (1950) die Wachstumskurve in submerser Kultur der 3. Potenz. Er hat sie daher als „kubische Wachstumsphase“ bezeichnet. In Oberflächenkultur folgt sie annäherungsweise der 2. Potenz; dies traf bei *Polystictus* und *Coniophora* zu (a). Während dieser Zeit nahmen nicht nur Wachstum und Atmung zu (a u. b), sondern auch die Atmungs-

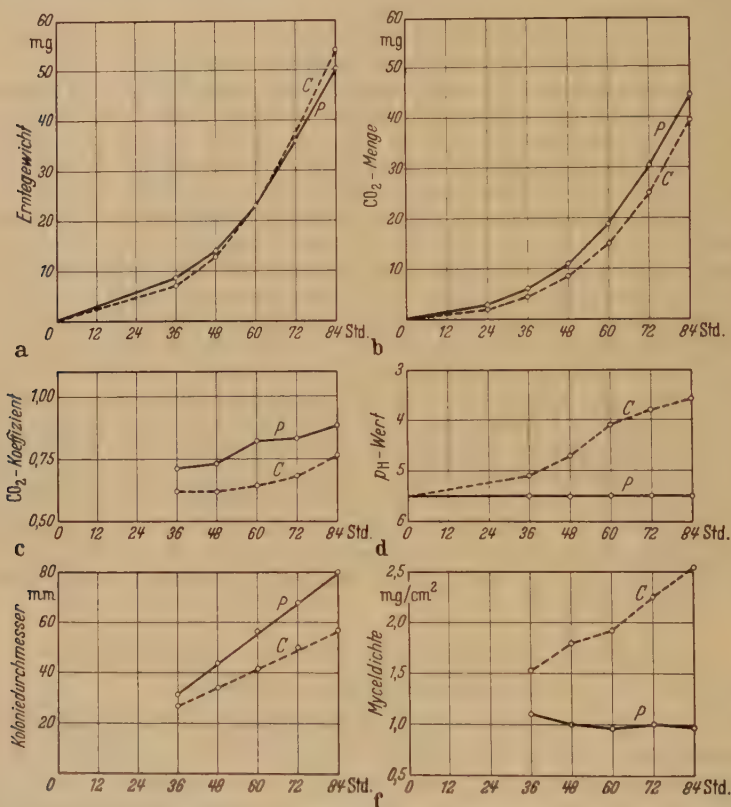


Abb. 3. Physiologische Leistungen von *Polystictus* (P) und *Coniophora* (C) nach verschiedener Kulturdauer auf 7% iger Biomalzlösung.

intensität ($\text{CO}_2/\text{mg. Std}$), so daß das Verhältnis CO_2 -Menge je mg Mycelgewicht = CO_2 -Koeffizient (nach WAKSMAN 1927) langsam größer wurde (c in Abb. 3). Der pH-Wert der Nährlösung von *Polystictus* blieb dabei unverändert, bei *Coniophora* wurde er dagegen kleiner (d). Das Verhältnis Mycelgewicht je Quadratzentimeter Kolonieoberfläche (= Myceldichte) veränderte sich bei *Polystictus* nicht (f), da die Zunahme der Mycelmasse der Zunahme der bedeckten Oberfläche proportional war. Bei *Coniophora* stieg es dagegen an; hier erfolgte auch

in älteren Mycelteilen noch sehr intensives Wachstum, was auch äußerlich zu erkennen war. Natürlich ist die „Myceldichte“ nur Durchschnittswert für die ganze Kolonie; sie ist in der Mitte größer und am Rande geringer.

Nach den Ergebnissen anderer Autoren (DARBY u. GODDARD 1950; SMITH 1949a) wird die Wachstumskurve dann flacher und erreicht einen Endwert, der mit beginnender Autolyse unterschritten wird. Etwa am Wendepunkt der Wachstumskurve erreicht die Atmungsintensität ihren höchsten Wert und sinkt dann auf einen Bruchteil des maximalen Wertes ab.

Die eigenen Versuche wurden alle auf die Phase ansteigender Atmungsintensität beschränkt, da später oft Teile des Mycels in nicht mehr voll lebendem Zustand sind (BULLER 1933).

Einen Überblick über die durch die Testpilze während der Versuchszeit gebildeten Mycel- und CO₂-Mengen gibt Tab. 2 (jede Zahl ist Mittelwert aus 28 Kulturen ohne Zusätze, die sich über die ganze Versuchszeit verteilen). Für jeden Pilz ist eine bestimmte Stärke des Wachstums und der Atmung charakteristisch. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kolonien (Koloniedurchmesser) ist nur sehr bedingt ein Maßstab der tatsächlichen Wachstumsleistung; diese zeigt sich eindeutig nur im Myceltrockengewicht. Den p_H-Wert der Nährlösung veränderten nur *Coniophora* (von 5,6 auf 3,8—3,6) und *Schizophyllum* (von 5,6 auf 5,4 bis 5,2).

Tabelle 2. Physiologische Leistungen der Testpilze während einer Kulturzeit von 84 Std (*Schizophyllum* 60 Std).

Pilz	CO ₂ -Produktion in mg	Myceltrocken- gewicht in mg	CO ₂ -Koeffizient	Koloniedurch- messer in cm	Mycel- „dichte“ mg/cm ²
<i>Fomes</i>	31,09 ± 0,95	43,17 ± 1,20	0,72	5,80 ± 0,06	1,63
<i>Trametes</i>	39,09 ± 1,67	56,00 ± 2,36	0,70	6,22 ± 0,09	1,84
<i>Coniophora</i>	45,37 ± 1,47	58,68 ± 1,63	0,775	5,60 ± 0,16	2,39
<i>Polystictus</i>	45,86 ± 2,20	53,84 ± 2,70	0,85	7,65 ± 0,16	1,17
<i>Schizophyllum</i>	60,61 ± 4,20	56,81 ± 3,10	1,06	4,60 ± 0,16	3,41

Um den günstigsten Bereich der Nährlösungskonzentration zu ermitteln, wurde das Wachstum von *Polystictus* und *Coniophora* auf 1-, 4-, 6- und 10% iger Biomalzlösung geprüft. Wie die Kurven in Abb. 4a erkennen lassen, wurde das Erntegewicht zwischen 6 und 10% nur wenig von der Konzentration beeinflusst. Da die Atmung sich fast in gleichem Maße änderte, war die Veränderung des CO₂-Koeffizienten in diesem Bereich geringfügig (b). Auf den Koloniedurchmesser von *Coniophora*

hatte die Nährlösungskonzentration fast keinen Einfluß (siehe auch FALCK, 1907, und ZYCHA, 1937), nur die Myceldichte wurde größer (1% 0,95 mg/cm²; 4% 2,65 mg/cm²; 6% 3,2 mg/cm²; 10% 3,3 mg/cm²). Bei *Polystictus* stieg der Durchmesser aber von 1—6% an (1% 5,7 cm; 4% 7,4 cm; 6% 7,8 cm und 9% 7,9 cm) und die Myceldichte war kaum verändert (1% 1,07 mg/cm²; 9% 1,16 mg/cm²).

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden alle Versuche zur Wachstums- und Atmungsmessung, so weit nicht anders erwähnt, bei einer Malzkonzentration von 7% durchgeführt.

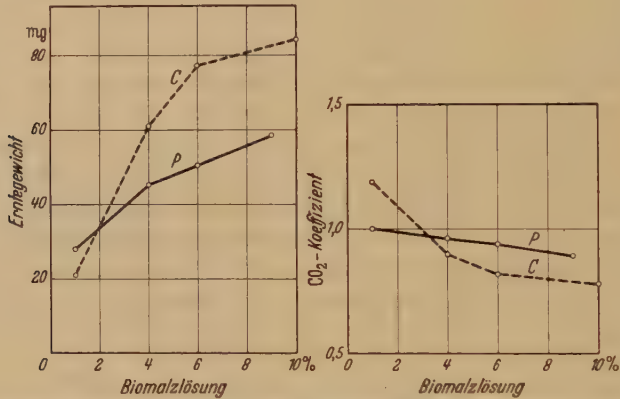


Abb. 4. Erntegewicht und CO₂-Koeffizient von *Polystictus* (P) und *Coniophora* (C) in Abhängigkeit von der Nährlösungskonzentration.

III. Hauptversuche.

A. Wirkungen zersetzter Nährlösungen auf die Testpilze.

1. Einfluß auf Mycelgewicht und Atmung.

Die Kurven in Abb. 5 zeigen den Einfluß verschiedener Konzentrationen der durch die Hemmstoffbildner zersetzten Nährlösungen auf Wachstum und Atmung der Testpilze¹.

Ein Blick über die obere Querreihe (A)² zeigt, daß das Erntegewicht der meisten Pilze (65%) mit steigender Konzentration der Hemm-

¹ Wachstum und Atmung bis zur Zugabe der Lösungen (36 Std nach Beimpfen) waren nur sehr gering. Die Atmung z.B. betrug bei *Coniophora* $11,2 \pm 0,35\%$, *Polystictus* $15,3 \pm 0,27\%$, *Fomes* $13,6 \pm 0,21\%$, *Trametes* $16,5 \pm 0,43\%$ und *Schizophyllum* $27,8 \pm 0,51\%$ der Gesamtmenge (Versuchsdauer 84 Std).

² Jede Teilfigur der Abb. 5 ist durch die Buchstaben am linken Rand und die Zahlen am oberen Rand gekennzeichnet; z. B. bedeutet das Feld B3, daß die Atmung (CO₂-Menge) unter der Wirkung von *Polyporus*-Lösung gemessen wurde. Innerhalb jedes Feldes sind die Kurven mit den Anfangsbuchstaben der Gattungsnamen der Pilze, die auf die betreffende Lösung gebracht wurden, bezeichnet; B3P bedeutet also die Atmungskurve für *Polystictus*, B3T die für *Trametes* usw.

stoffe geringer wurde. Besonders deutlich ist dies bei den Versuchen mit *Merulius*-Lösung (*A1*); hier wurde in 2 Fällen das Mycel des Testpilzes während des Versuches sogar abgetötet (*Fomes* in 70 und 42 E/cm³, *A1F*). Auch *Polystictus* zeigte auf 58 E/cm³ *Merulius*-Hemmstoff keinen Zuwachs mehr (*A1P*), wuchs aber auf frischem Nährboden nach 4 Tagen wieder an. Dagegen trat z. B. durch *Xylaria*-Lösung bei *Trametes* niemals völliger Wachstumsstillstand ein (*A4T*) (auf 39 E/cm³ 65%, auf 98 E/cm³ immer noch 59% der Kontrolle¹). Mit Ausnahme von *Merulius* traten bei allen Lösungen aber auch Abweichungen auf. In 2 Kombinationen (6%) wurde das Wachstum erst bei hoher Konzentration gehemmt (*A2P*, *A3C*); in 3 Fällen war gar kein Einfluß der Hemmstoffe vorhanden (*A3P*, *A4S*, *A7T*), und in 7 Kombinationen (20%) wirkten die zersetzten Nährlösungen in niedriger Konzentration sogar mehr oder weniger wachstumsfördernd auf die Pilze, während bei hoher Konzentration auch hier Wachstumshemmung oder wenigstens keine Förderung mehr eintrat (*A4P*, *A4C*, *A5P* u. *A5T*, *A6F*, *A7P* u. *A7T*).

Sehr unterschiedlich wurde die Atmung durch die zersetzten Nährlösungen beeinflußt (Querreihe *B*). Während sie durch steigende Konzentrationen der *Merulius*-Lösung bei allen 5 Testpilzen abnahm (*B1*), trat bei den anderen Lösungen, besonders bei niedrigen Konzentrationen, auch erhöhte CO₂-Abgabe auf (z. B. alle *B3*, ferner *B2T*, *B2P*, *B2C*), oder es fehlte in dem gemessenen Bereich jeder Einfluß (z. B. *B4S*, *B6F*). Dabei schien das Verhalten stärker von den Testpilzen als von den Eigenschaften der geprüften Lösungen bestimmt zu werden, denn *Coniophora* und *Polystictus* gehörten fast immer zu den Pilzen mit erhöhter Atmung (*B2*, *B3*, *B4*, *B7*), *Schizophyllum* zu denen mit verringerter (*B2S*, *B3S*, *B7S*) oder unveränderter (*B4S*, *B5S*, *B6S*) und *Fomes* und *Trametes* standen in ihrem Verhalten in der Mitte (z. B. in *B3* und *B4*).

Ein besseres Bild der Atmungsreaktion erhält man jedoch, wenn man die Atmung auf das Wachstum bezieht, also den CO₂-Koeffizienten bildet (Querreihe *C*). Dann lassen sich die Ergebnisse in folgender Weise gruppieren:

I. Der CO₂-Koeffizient stieg mit zunehmender Konzentration der Hemmstoffe (häufigster Fall mit 60%).

A. Der CO₂-Koeffizient erreichte Werte zwischen 200 und 450% der Kontrolle (*C1P*, *C1T*, *C1F*, *C2F*, *C2T*, *C3F* u. *C3T*).

a) Mit steigender Hemmstoffkonzentration nahm das Wachstum stark, die Atmung jedoch nur wenig ab (*1P*, *1T*, *1F*, *2F*).

b) Das Wachstum nahm ab; die Atmung nahm bei niedriger Konzentration zu und erst bei hoher ab (*2T*, *3F* u. *3T*).

¹ In weiteren Versuchen zeigte auch *Polystictus* selbst auf 145 E/cm³ *Xylaria*-Hemmstoff keinen völligen Wachstumsstillstand.

- B. Der CO_2 -Koeffizient stieg mit zunehmender Hemmstoffkonzentration, jedoch höchstens bis etwa 200% der Kontrolle (z. B. *C1S*, *C2P*, *C3C*, *C5C*, *C6T* u. *C7F*).
 a) Das Wachstum nahm mit steigender Hemmstoffkonzentration stärker ab als die Atmung (*1C* u. *1S*, *2S*, *7F* u. *7S*).

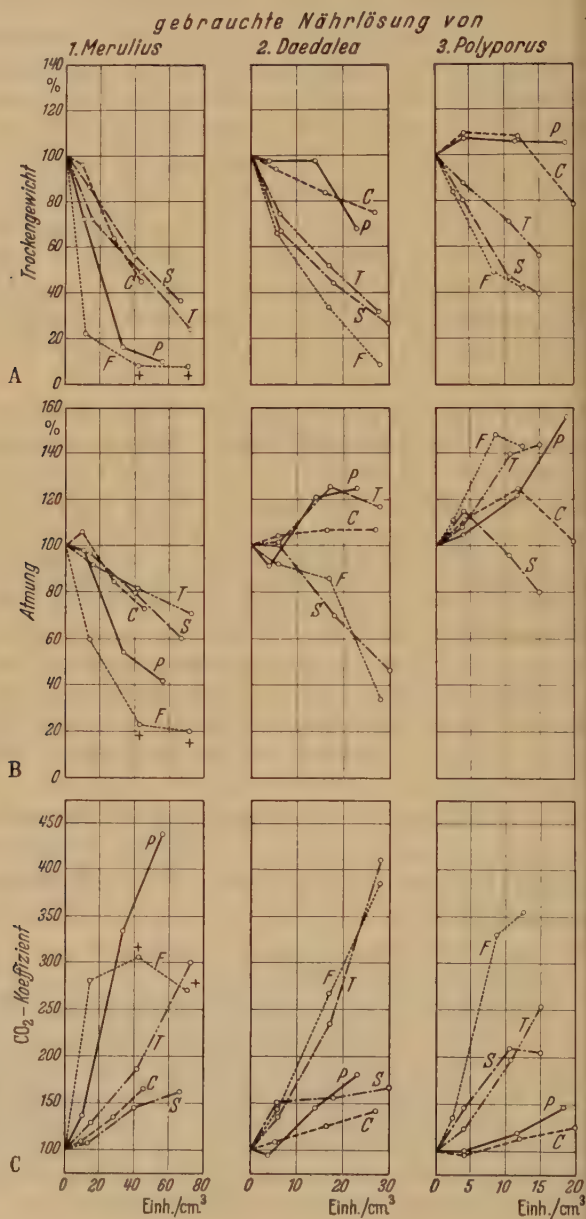
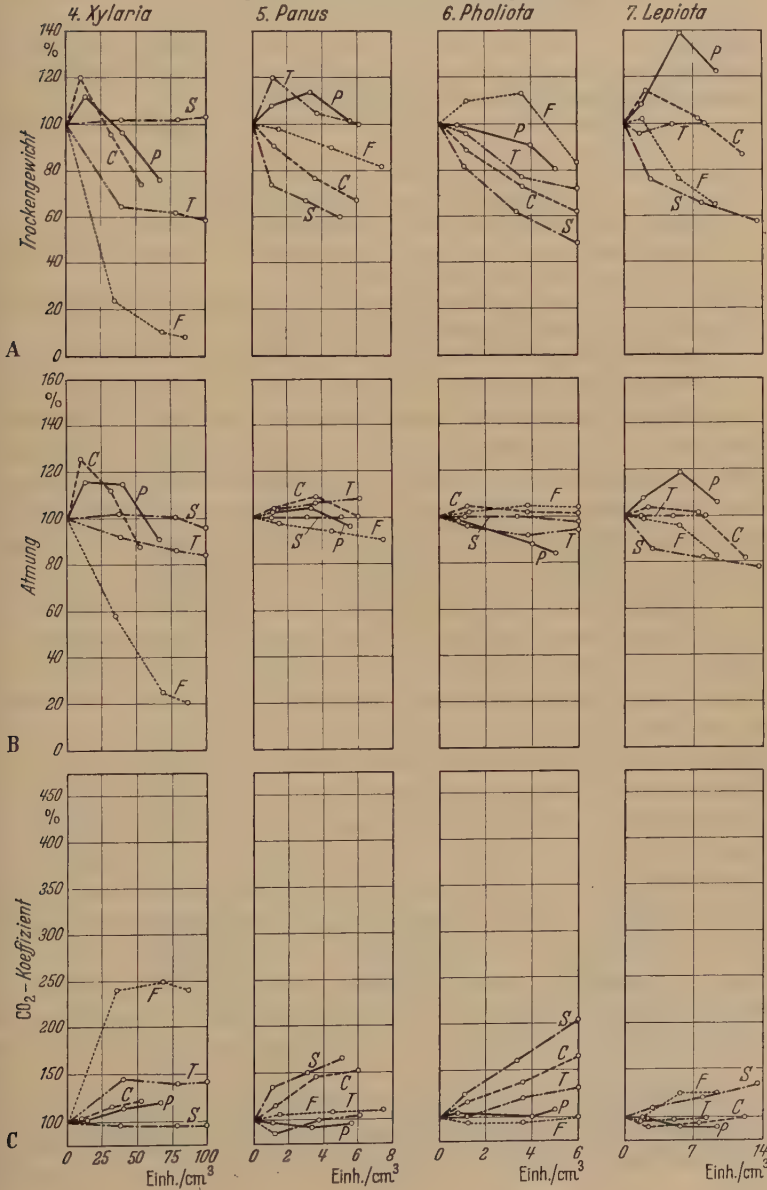


Abb. 5. Einfluß der gebrauchten Nährlösungen auf Wachstum (A), Atmung (B) und CO_2 -Koeffizient (C) der Testpilze *Polystictus* (P), *Coniophora* (C), *Trametes* (T), *Fomes* (F) und *Schizophyllum* (S). (+ bei *Fomes* in den Teilfiguren unter 1 besagt, daß der Pilz vor Versuchsende tot war.)

- b) Das Wachstum nahm mit steigender Konzentration ab, die Atmung blieb unverändert (2C, 5F u. 5C, 5S, 6C, 6T u. 6S).
- c) Das Wachstum nahm ab, die Atmung jedoch zu, zumindest bei niedriger Konzentration (3S).

gebrauchte Nährlösung von



- d) Das Wachstum nahm erst bei hoher Konzentration ab, die Atmung wurde bei niedriger verstärkt und nahm bei hoher nur wenig ab (2P, 3C).
- e) Das Wachstum blieb unverändert, die Atmung wurde bei steigender Konzentration etwas verstärkt (3P).
- II. Der CO₂-Koeffizient stieg nur bis zu einem Grenzwert an (z. B. C4F). Dies war, mit Ausnahme von *Schizophyllum*, der unempfindlich war, bei allen Testpilzen auf *Xylaria*-Lösung der Fall (C4). Die Grenze des Anstiegs lag einheitlich bei etwa 30 E/cm³; bei höherer Hemmstoffkonzentration wurde der CO₂-Koeffizient nicht mehr größer. Dabei konnten Wachstum und Atmung abnehmen mit steigender Konzentration (4T u. 4F) oder bei niedriger Konzentration gefördert sein und erst bei hoher gehemmt (4P u. 4C).
- III. Der CO₂-Koeffizient blieb unverändert oder wurde etwas kleiner (z. B. C4S bzw. C7P).
- A. Der CO₂-Koeffizient blieb unverändert.
- Wachstum und Atmung nahmen gleichmäßig ab (6P).
 - Wachstum und Atmung blieben unverändert (4S, 7T).
 - Beide nahmen bei niedriger Konzentration in gleichem Maße zu und bei höherer in gleichem Maße ab (7P, 7C).
- B. Der CO₂-Koeffizient wurde bei niedriger Hemmstoffkonzentration etwas kleiner, doch ist die Differenz nicht zu sichern.
- Das Gewicht stieg bei niedriger Konzentration an, die Atmung nicht oder schwächer, sonst wie III.A.c (5P u. 5T, 6F, 7P u. 7C).

Die zersetzten Nährlösungen lassen, trotz der unterschiedlichen Wirkung auf die einzelnen Testpilze, doch gewisse einheitliche Grundzüge ihrer Wirkung erkennen. Zur Gruppe I gehören alle Kombinationen mit *Merulius*-, *Daedalea*- und *Polyporus*-Lösungen. Vor allem bei den beiden letzteren scheinen wenigstens z. T. übereinstimmende Faktoren wirksam gewesen zu sein (vgl. Abb. 5, A2 u. A3 bzw. B2 u. B3), während durch *Merulius*-Lösung das Wachstum stärker gehemmt war (A1) und nur die Atmung von *Coniophora* (nicht gesichert) die Kontrolle überstieg (B1C bei 10 E/cm³). Da bei gleicher Hemmung des Wachstums der CO₂-Koeffizient in der Kombination *Daedalea-Trametes* (C2T) um mehr als 100% größer war als bei *Daedalea-Schizophyllum* (C2S), wurde die Unterteilung I. A. und I. B. getroffen, da es möglich ist, daß hier zwei verschiedene Wirkungsweisen der gleichen Lösung vorliegen. Die Wirkung der *Xylaria*-Lösung dagegen scheint ziemlich einheitlich gewesen zu sein; hier war wohl nur die Empfindlichkeit verschieden; das Wachstum von *Polystictus* und *Coniophora* wurde von niedriger Konzentration sogar gefördert (A4P u. A4C). Die Hemmung durch Lösungen von *Panus*, *Pholiota* und *Lepiota* betraf vorwiegend das Wachstum (A5, A6, A7), während die Atmung nur wenig beeinflusst wurde (B5, B6 u. B7). Die 3 Lösungen enthielten außerdem für einzelne Testpilze wirksame wachstumsfördernde Faktoren (z. B. A5T, A6F u. A7P).

2. Beeinflussung von Koloniedurchmesser und Dichte.

Die gegen Pilze wirksamen Antibiotica hemmen die Ausbreitung der Mycelien sehr stark, so daß sie durch diese Eigenschaft meistens nach-

gewiesen (z. B. HARDER 1911; MANDELS u. SIU 1950; OPPERMAN 1951) und ihre Konzentrationen dadurch bestimmt wurden (Lochtest: Seite 322). Auch in Flüssigkeitskulturen tritt diese Hemmung auf, wie die 3 Beispiele in Abb. 6, Querreihe A, zeigen. Die Kurven fallen nach rechts,

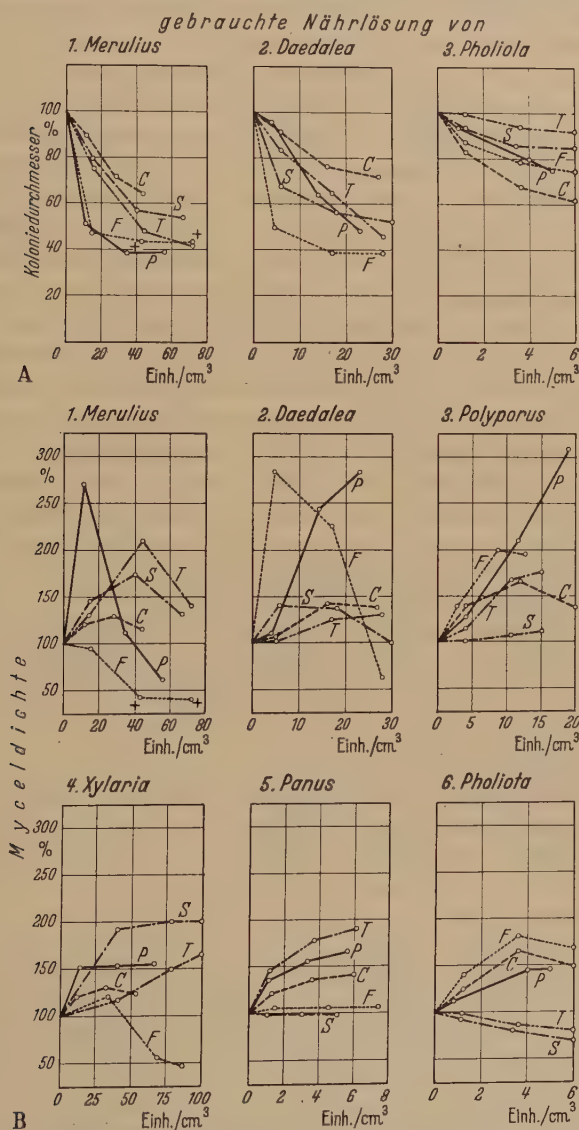


Abb. 6. Änderung von Koloniedurchmesser (A) und Myceldichte (B) durch verschiedene Konzentrationen der gebrauchten Nährlösungen. Testpilze waren *Polystictus* (P), *Coniophora* (C), *Trametes* (T), *Fomes* (F) und *Schizophyllum* (S). (+ bei *Fomes* in A1 und B1 besagt, daß der Pilz vor Versuchsende tot war.)

d. h. der Koloniedurchmesser wurde mit steigender Konzentration der zersetzten Nährlösungen immer kleiner¹. Am stärksten war die Hemmung der Mycelausbreitung bei allen 5 Testpilzen durch *Merulius*-Lösung (*A1*) (Durchmesser der Kolonien zwischen 39 und 63% der Kontrolle) und am schwächsten bei *Lepiota* (Durchmesser zwischen 73 und 100% der Kontrolle). Auch die Lösungen von *Pholiota* (*A3*) und *Panus* waren wenig wirksam (zwischen 70 und 90 bzw. 62 und 93% der Kontrolle).

Die Hemmung der einzelnen Testpilze war dabei je nach der zugesetzten Lösung sehr verschieden stark. So wurde der Durchmesser von *Fomes* durch *Merulius*- (*A1F*), *Daedalea*- (*A2F*), *Polyporus*- und *Xylaria*-Lösung zwar am stärksten von allen Testpilzen vermindert (38 bis 44% der Kontrolle, d. h. der Zuwachs war nach Zugabe der zersetzten Nährlösung fast völlig eingestellt worden), auf der *Panus*-Lösung war er dagegen weniger gehemmt als irgend ein anderer Pilz und auch auf der *Pholiota*-Lösung war die Hemmung nicht sehr stark (*A3F*). Am unempfindlichsten war im großen ganzen *Coniophora* (in Beispiel *A1C* u. *A2C* unempfindlicher als alle anderen untersuchten Pilze); auf *Lepiota*-Lösung blieb ihr Durchmesser selbst bei höchster Konzentration unverändert. Auf *Panus*- und *Pholiota*-Lösung wurde die Mycelausbreitung von *Coniophora* jedoch stärker als die irgend eines anderen Testpilzes gehemmt (Beispiel *A3C*); ihr Durchmesser erreichte mit 62% der Kontrolle auf *Pholiota*-Lösung den für *Coniophora* überhaupt niedrigsten Wert während der Versuche.

Zu erwähnen wäre noch, daß eine Förderung der Mycelausbreitung, wie sie HARDER (1911) z. B. bei *Coniophora* durch *Penicillium* gefunden hat, in keiner der 35 Kombinationen beobachtet wurde (siehe auch Seite 339).

Ganz anderen Verlauf als in der Reihe A zeigen die Kurven in den beiden unteren Reihen (*B*) in Abb. 6, die die Myceldichte, d. h. das Verhältnis Myceltrockengewicht/Quadratcentimeter vom Mycel bedeckter Oberfläche (in Prozent der Kontrolle) wiedergeben². Die weit überwiegende Zahl dieser Kurven steigt nach rechts an; die Myceldichte wird also mit steigender Hemmstoffkonzentration größer (z. B. *B1T*, *B2P*, *B3P*, *B4S* u. a.), doch kann sie auch unverändert

¹ Zu berücksichtigen ist, daß durch das Impfstück und dessen Zuwachs der Durchmesser bis zur Zugabe der Lösungen (36 Std nach Beimpfung) schon 40% (*Schizophyllum* 55%) des normalen Durchmessers am Versuchsende (Kulturen ohne Zusatz) betrug. Das heißt, wenn z. B. bei *Coniophora* am Versuchsende der Koloniedurchmesser 70% der Kontrolle betrug, so war die Zunahme des Durchmessers unter Einfluß der zersetzten Nährlösungen nur die Hälfte des normalen, oder wenn der Durchmesser 40% betrug, so war gar kein Zuwachs mehr erfolgt.

² Die *Lepiota*-Lösung zeigte keine grundsätzlichen Abweichungen und wurde deshalb zur Platzersparnis fortgelassen.

bleiben (z. B. *B5F* u. *B5S*) oder geringer werden (*B1F*). Daß die Testpilze sich auf der gleichen Lösung verschieden verhalten können, zeigt besonders die *Pholiota*-Lösung (*B6*), auf der 3 Kurven ansteigen (*B6P*, *B6C*, *B6F*) und 2 schwach abfallen (*B6T* u. *B6S*). Es besteht auch weder ein Zusammenhang zwischen der Hemmung der Mycelausbreitung und der Änderung der Myceldichte (man vgl. z. B. *Fomes* in *A1* u. *B1* mit *A2* u. *B2*), noch ist das Ansteigen der Myceldichte eine konstante Eigenschaft des Testpilzes (vgl. *B5T* u. *B6T*). Zum Teil gehen die Kurven aus anfänglich aufsteigender Richtung bei hoher Hemmstoffkonzentration wieder in absteigende über (besonders bei *Merulius*- und *Daedalea*-Lösungen, *B1* u. *B2*); während größere Myceldichte bedeutet, daß die Mycelausbreitung stärker gehemmt wird als die Mycelbildung, wird bei abfallender Kurve nun auch die Mycelbildung zunehmend gehemmt (wie bei nur abfallenden Kurven bei jeder Konzentration), bis schließlich beide zum Erliegen kommen können (*B1F*).

Das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Testpilze bei der Änderung von Koloniedurchmesser und Dichte zeigt, daß die Hemmung der Mycelausbreitung nur sehr bedingt ein Maß für die Hemmung der Neubildung von Mycelsubstanz ist.

B. Wirkung einzelner Faktoren auf die Pilze.

1. Einfluß von p_H -Änderungen und Säuren.

Die von *Merulius*, *Daedalea* und *Polyporus* zersetzten Nährlösungen enthielten neben anderen Stoffwechselprodukten auch Säuren in größerer Menge (p_H der Biomalzlösung beim Animpfen 5,6; am Ende der Kultur nach dem Einengen 2,6—2,0).

Es dürfte sich dabei in der Hauptsache um Oxalsäure handeln, die bei *Merulius* durch SMITH (1949a) und bei *Daedalea* in eigenen Versuchen¹ nachgewiesen worden ist und nach WEHMER und HADDERS (1932) auch bei *Polyporus* vorkommt. Doch treten zweifellos bei den letzten beiden Pilzen noch andere Säuren auf.

Schwach sauer waren auch die Nährlösungen von *Panus* und *Pholiota* (p_H 4,6—4,4), praktisch unverändert die von *Xylaria* und *Lepiota* (p_H 5,4—5,6).

In Tab. 3, sind unter Nr. 1—7 für *Polystictus* Erntegewichte und p_H -Werte der Kulturlösungen am Ende der Versuche mit diesen zersetzten Nährlösungen zusammengestellt. Ein Zusammenhang zwischen beiden bestand nicht, denn auf der Lösung von *Daedalea* (2) z. B. ist das Erntegewicht sehr viel größer als auf *Merulius* (1), trotzdem der p_H -Wert bei beiden fast der gleiche war, und auch auf den praktisch unveränderten Lösungen von *Xylaria* (6) und *Lepiota* (7) treten ähnlich große Unterschiede im Erntegewicht auf.

¹ Methode nach J. SCHMIDT (1932).

Weitere Versuche mit Oxalsäure und Zitronensäure (0,06 und 0,12%) zeigten, daß Oxalsäure auf *Polystictus* giftig wirkt (7 u. 8 in Tab. 3), während die selber Oxalsäure bildende *Coniophora* nur wenig gehemmt wurde (bei p_H 2,7 erreichte das Erntegewicht noch 83% der Kontrolle). Im Gegensatz zu *Coniophora* veratmet *Polystictus* dabei Oxalsäure (der p_H -Wert stieg während der Kultur von 3,4 auf 3,9 und der CO_2 -Koeffizient auf das Doppelte der Kontrolle).

Die Wirkung der Oxalsäure reicht jedoch nicht aus, um z. B. die Hemmung durch *Merulius*-Lösung bei *Pholiota* zu erklären (vgl. 1 u. 8 in Tab. 3), wenn sie auch sicher daran mitwirkt; andererseits war die Hemmung z. B. durch *Polyporus*-Lösung (3) geringer als bei Veränderung des p_H -Wertes durch Oxalsäure allein zu erwarten gewesen wäre. Hier müssen noch andere, nicht giftige Säuren in der Nährlösung vorgelegen haben.

Tabelle 3. p_H -Wert der Nährlösungen und Mycelgewicht (in % der Kontrolle) von *Polystictus*.

Zusatz zum Substrat	Tgw. %	p_H	Tgw. %	p_H	Tgw. %	p_H	Kontrolle p_H
1. <i>Merulius</i> -Lösung	10	3,8	16	4,0	72	4,9	5,6
2. <i>Daedalea</i> -Lösung	69	3,9	99	4,2	97	4,8	5,6
3. <i>Polyporus</i> -Lösung	106	4,1	106	4,6	108	5,0	5,6
4. <i>Pholiota</i> -Lösung	80	4,8	91	5,2	99	5,2	5,6
5. <i>Panus</i> -Lösung	101	5,0	114	5,2	106	5,4	5,5
6. <i>Xylaria</i> -Lösung	76	5,4	97	5,5	112	5,5	5,6
7. <i>Lepiota</i> -Lösung	122	5,5	139	5,5	109	5,5	5,5
8. Oxalsäure	48	3,9	73	4,5	—	—	5,6
9. Citronensäure	104	4,0	108	4,5	100	4,9	5,6

2. Einfluß von Streptomycin, Colchicin und einem Sulfonamid.

Als Versuch, zu einer Vorstellung über die wirksamen Prinzipien in den zersetzten Nährlösungen zu gelangen, wurden die Testpilze auf einigen Hemmstoffen bekannter Wirkung angesetzt.

Geprüft wurde Colchicin als Mitosegift (LETTRE u. ALBRECHTS 1951), Streptomycin, das durch Salzbildung mit Nucleinsäuren wirkt (BERKMAN u. Mitarb. 1947; KLEIN u. KIMMELMANN 1947; u. a.) und ein Sulfonamid (Sufanilamido-thiazol als Präparat Cibazol der Ciba A.G.) als Antagonist der p-Aminobenzoessäure (TSCHECHE 1947, 1951; TSCHECHE, SOEHRING u. HARDER 1947; BRÜCKE u. KAINDL 1947 u. a.). Testpilz war *Fomes*.

Colchicin (0,1, 0,3 u. 0,5 mg/cm³) und Streptomycin (0,4, 1,2 u. 2,0 mg/cm³) hatten keinen erkennbaren Einfluß auf das Erntegewicht der Testpilze; lediglich der Koloniedurchmesser wurde durch beide Mittel reduziert (um 10%), und die Dichte stieg dementsprechend an; auch die Atmung wurde nicht beeinflusst. Im Lochtest gegen *Staphylococcus aureus* war bei beiden Stoffen eine Aktivitätsabnahme durch Substanzen der Nährlösung nicht nachweisbar. Es handelt sich also um eine echte Resistenz¹. — Da Sufanilamido-thiazol nur begrenzt löslich ist

¹ Resistenz von Pilzen gegen Streptomycin fand auch LITTMANN (1947), und CAFIFERO u. ZAMBRUNO (1952) erhielten die ausgeprägteste Hemmung von *Staphylococcus aureus* erst durch 5 mg/cm³ Colchicin.

(1,5% bei 20° C), wurden hiervon Konzentrationen bis 2% angewendet, um auch eine gesättigte Lösung zu prüfen. Die Atmung wurde dadurch in dem gemessenen Zeitraum nicht wesentlich verändert, dagegen betrug die gebildete Mycelmenge bei 2% Sulfanilamido-thiazol nur 72% der Kontrolle. Der CO₂-Koeffizient wurde demgemäß größer (er stieg auf 144%). In gleichem Maße wie das Gewicht wurde der Koloniedurchmesser vermindert, daher war die Dichte bei allen Konzentrationen etwa gleich. Trotz gesättigter Lösung trat jedoch kein völliger Stillstand, sondern nur Verlangsamung des Wachstums ein.

Im Gegensatz zu dem praktisch unwirksamen Colchicin und Streptomycin bewirkte Sulfanilamido-thiazol bei *Fomes* also Wachstumshemmung und Anstieg des CO₂-Koeffizienten, ähnlich wie wir es bei der Wirkung der meisten hemmstoffhaltigen Nährlösungen gefunden hatten.

3. Wachstumsfördernde Faktoren.

Durch Zugabe niedriger Konzentrationen der zersetzten Nährlösungen trat in etwa einem Fünftel aller Kombinationen eine Erhöhung des Erntegewichts der Testpilze im Vergleich zur Kontrolle ein (Abb. 5, z. B. *B4P*, *B4C*, *B7P*). Der Koloniedurchmesser wurde dabei niemals vergrößert, sondern nur die Myceldichte erhöht (siehe aber Seite 339).

Als Grund dafür wäre einmal denkbar, daß die zersetzten Nährlösungen Zwischenprodukte des Kohlenhydratabbaus enthielten, die vom Pilz besser als Maltose verwendet wurden. Da die fördernden Lösungen nicht oder nur sehr schwach sauer waren, ist dies jedoch nicht wahrscheinlich. Andererseits wäre auch an eine Umlagerung des Maltosemoleküls in eine andere, besser verwertbare Hexose zu denken; Untersuchungen in dieser Richtung wurden nicht durchgeführt. Weiter ist möglich, daß sich bei der Zersetzung der Nährlösungen wuchsstoffartige Faktoren angereichert haben oder der Hemmstoff selber in niedriger Konzentration stimuliert (ARNDTSches Gesetz, RIPPPEL-BALDES 1951). Beides hat z. B. WALLHÄUSSER (1951a) bei Bakterien nachgewiesen.

Deshalb wurde zuerst geprüft, ob es möglich ist, in einer 7% igen Malzlösung noch Förderungen durch Zusatz gewisser Medien zu erreichen. Dazu wurde Hefeextrakt verwendet (100 g Preßhefe auf 250 cm³ Wasser; Trockensubstanz des Extraktes 10 mg/cm³), der nach FRIES (1938, 1949, 1950b) und anderen Autoren (WASSINK 1934; COCHRANE 1950) eine große Anzahl Wachstumsfaktoren enthält. Durch den Hefeextrakt wurde das Erntegewicht der drei geprüften Pilze erhöht (Tab. 4)¹.

Die Förderung von *Polystictus* und *Coniophora* war größenordnungsmäßig fast die gleiche wie z. B. im Versuch mit *Xylarialösung* (112% bzw. 120% der Kontrolle in Abb. 5, *B4P* u. *B4C*). Da die Nährstoffkonzentration durch den Hefeextrakt praktisch nicht verändert wurde (die Zunahme der Nahrungssubstanz betrug 0,4%), muß dieser einen Wachstumsfaktor enthalten, der im Malzextrakt nicht vorliegt.

Auf einem ähnlichen Faktor und nicht auf Stimulation beruhte die fördernde Wirkung der von *Xylaria* zersetzten Nährlösung, denn wie Tab. 5 zeigt, wurde der Förderungsfaktor weder durch Oxydation, die

¹ Methodik wie Seite 321 angegeben.

Tabelle 4. *Myceltrockengewicht von Polystictus, Coniophora und Schizophyllum bei Kultur auf 7% Biomalzlösung mit und ohne (Kontrolle) Hefeextraktzusatz (1 cm³ auf 50 cm³ Malzlösung).*

	<i>Coniophora</i>		<i>Polystictus</i>		<i>Schizophyllum</i>	
	Tgw.	pH	Tgw.	pH	Tgw.	pH
Ohne Hefeextrakt	66,4	3,7	32,8	5,6	85,5	5,4
Mit Hefeextrakt ¹	76,4	3,5	38,5	5,6	95,0	5,2
Gewicht in Prozent	115		118		111	
(ohne Extrakt = 100%)						

Tabelle 5. *Wachstumsförderung von Coniophora durch Zusatz von Xylarialösung (5 E/cm³ Hemmstoff)².*

	Malzlösung (Kontrolle)	Malzlösung + <i>Xylaria</i> -Lösung	Malzlösung + <i>Xylaria</i> -Lösung oxydiert	Malzlösung <i>Xylaria</i> -Lösung 100° erhitzt
Gewicht in mg . .	37,9	45,6	44,6	46,0
Gewicht in % . .	100	120	118	121

den Hemmstoff zerstört (siehe Seite 341), noch durch Erhitzen auf 100° ausgeschaltet.

Daß die Stoffwechselprodukte von *Xylaria* und *Panus* für einige Mikroorganismen notwendige Wachstumsfaktoren sind, geht aus Tab. 6 hervor.

Tabelle 6. *Wirkung der Stoffwechselprodukte von Xylaria und Panus auf das Wachstum verschiedener Mikroorganismen (+ Wachstum, — kein Wachstum).*

	Kontrolle (ohne Zusatz)	mit Lösung (in cm ³) von			
		<i>Xylaria</i>		<i>Panus</i>	
		0,1	0,5	0,1	0,5
<i>Pseudomonas pyocyanea</i> .	+	+	+	+	+
<i>Bacterium prodigiosum</i> . .	+	+	+	+	+
<i>Hefe B</i>	—	+	++	+	++
<i>Bacillus subtilis</i>	—	+	+	+	+
<i>Bacillus mycoides</i>	—	+	+	—	—

Xylaria und *Panus* wurden auf je 50 cm³ definierter Nährlösung³ in 300 cm³ ERLÉNMEYER-Kolben kultiviert. Nach 16 Tagen wurden je 0,1 und 0,5 cm³ Kulturlösung zu Röhren mit je 2,5 cm³ Nährlösung der gleichen Zusammensetzung zugesetzt und diese mit einer Öse einer Bakterien- bzw. Hefeaufschwemmung in sterilem Wasser beimpft. Bebrütung bei 25° C 48 Std.

Dabei müssen die in die Nährlösung ausgeschiedenen Faktoren wenigstens z. T. bei beiden Pilzen verschieden gewesen sein, denn *Bacillus*

¹ Differenz der Mycelgewichte bei *Coniophora* gut ($P = 0,001$), *Polystictus* nicht ($P = 0,08$), *Schizophyllum* nicht ($P = 0,09$) gesichert.

² Differenzen gut gesichert ($P = 0,0014$; 0,0015; 0,001).

³ Glucose 2%; Ammoniumtartrat 0,5%; KH₂PO₄ 0,075%; K₂HPO₄ 0,025%; MgSO₄ · 7 H₂O 0,05%; CaCl₂ 0,01%; FeCl₃ Spur; B₁ 1 mg/Liter.

mycoides wuchs zwar mit *Xylaria*- aber nicht mit *Panus*-Stoffwechselprodukten.

KÖGL und FRIES (1937) haben zeigen können, daß einige Pilze Biotin sowohl im Mycel bilden als auch in der Nährlösung in größerer Menge anreichern. Andere Pilze dagegen sind mehr oder weniger biotin-heterotroph (KÖGL u. FRIES 1937; BARNETT u. LILLY 1948; PERLMAN 1949; FRIES 1950b).

Ein weiterer Versuch ergab nun, daß auch die *Hefe B* außer der Grundnährlösung noch Biotin zum Wachstum benötigte. Durch den Bewuchs mit *Xylaria* bzw. *Panus* muß die Nährlösung also biotinhaltig geworden sein (wurde auch für *Pholiota* nachgewiesen).

Die Biotinkonzentration wurde mittels *Hefe B* einerseits durch Vergleich der Trübung im Röhrchen (nur visuell, nicht photometrisch) und andererseits durch Vergleich der Wachstumszonen im Lochtest (Seite 313) bestimmt. Zum Vergleich wurde Biotin (von Hoffmann-La Roche) in verschiedener Konzentration verwendet.

Die nach Kultur von *Xylaria* in der Kulturlösung mittels *Hefe B* gefundene Biotinkonzentration (Tab. 7) betrug ein Mehrfaches der von KÖGL und FRIES (1937) bei *Phycomyces Blakesleeanus* gefundenen, war jedoch im Verhältnis zum Malz-

Tabelle 7. Biotinkonzentration von *Xylaria*-Lösung und Malzlösung.

	<i>Xylaria</i> -Lösung	1% Malzlösung
Trübungstest	2,0 γ/cm^3	20 γ/cm^3
Lochtest	3,2 γ/cm^3	27 γ/cm^3

extrakt sehr gering. Dessen Biotingehalt lag weit über der für biotin-heterotrophe Pilze als optimal bezeichneten Konzentration (KÖGL u. FRIES 1937; FRIES 1950b). Wie daher zu erwarten war, wurde das Wachstum von *Coniophora* auf Malzlösung durch Biotinzusatz weder gefördert noch sonst verändert. Der in Hefeextrakt und der Nährlösung von *Xylaria*-Kulturen mittels *Coniophora* und *Polystictus* nachgewiesene Wachstumsfaktor kann daher nicht Biotin sein.

Da *Phycomyces Blakesleeanus*, der nach SCHOPFER und JUNG (1936) aneurin-heterotroph ist, auch auf 1% Biomalzlösung gutes Wachstum zeigte, kann Aneurin ebenfalls nicht als Minimumfaktor vorgelegen haben.

Kennzeichnend für den vorliegenden Förderungsfaktor ist noch, daß die Wachstumsdifferenzen gegenüber der Kontrolle nach 14 Tagen wieder ausgeglichen sind.

Der in der Nährlösung von *Xylaria*-Kulturen auftretende Förderungsfaktor läßt sich somit nur negativ charakterisieren: er ist weder mit dem Hemmstoff noch mit Biotin oder Aneurin identisch und wird weder durch Oxydation noch Erhitzen zerstört. Außer diesem Faktor und dem nachgewiesenen Biotin treten in der Nährlösung von Pilzkulturen offenbar noch mehrere Stoffwechselprodukte auf, die bestimmte Organismen fördern.

4. Untersuchungen über die beschleunigte Ausbreitung des *Coniophora*-Mycels.

Photographien bei HARDER (1911) zeigen, daß in Mischkulturen von *Coniophora* mit *Penicillium* auf Pflaumensaftagar das Wachstum von

Coniophora über die *Penicillium*-Kolonie schneller war als auf dem freien Agar. Noch stärkere Wachstumsbeschleunigung beobachtete HARDER, wenn *Coniophora* über *Mucor* wuchs. Da in den eigenen Untersuchungen derartiges niemals beobachtet wurde (siehe auch OPPERMANN 1951), war es von Interesse, sich erneut mit dieser Erscheinung zu beschäftigen.

Die Wachstumsgeschwindigkeit von *Coniophora* war bei HARDER, der neutralisierten Pflaumensaftagar als Substrat verwendet hat, sehr viel geringer als in den vorstehenden eigenen Versuchen, nur die auf *Mucor* kommt unseren Werten nahe. Es wurde daher vermutet, daß ein Hemmstoff im Pflaumensaft die Wachstumsgeschwindigkeit von *Coniophora* verringert. Unter diesem Gesichtspunkt wurde der folgende Versuch angesetzt.

Als Nährboden diente Pflaumensaft von frischen Früchten und von 1 Jahr alten Trockenpflaumen. Beide wurden sowohl unverändert als auch mit KOH neutralisiert und mit KMnO_4 oxydiert verwendet. Die Platten (je 4) wurden mit *Coniophora* und in einiger Entfernung davon mit *Penicillium* (strichförmig) beimpft¹.

Tabelle 8. Täglicher Zuwachs von *Coniophora* (in mm) auf besonders behandeltem Pflaumensaftagar und einer lebenden *Penicillium*-Kolonie.

Nähragar			Wachstumsgeschwindigkeit	
			auf Agar	auf <i>Penicillium</i>
Pflaumensaft unverändert	frisch	pH = 4,6	7,6	10,6
	alt	pH = 5,4	8,9	11,9
Pflaumensaft oxydiert	frisch	pH = 6,0	10,5	10,3
	alt	pH = 6,2	11,0	11,7
Pflaumensaft neutralisiert	frisch	pH = 7,5	7,3	10,5
	alt	pH = 7,3	7,7	9,4
5% Malzagar			10,5	10,5

Sobald das *Coniophoramycel* auf die inzwischen entwickelte *Penicillium*-Kolonie traf, erfuhr das Wachstum in einigen Fällen tatsächlich eine Beschleunigung gegenüber dem Wachstum auf penicilliumfreiem Agar (Tab. 8). Dies war aber nur bei den Kulturen auf unverändertem und neutralisiertem Pflaumensaftagar der Fall. Auf dem oxydierten Pflaumensaft und dem Malzextrakt war eine solche Wachstumsbeschleunigung durch *Penicillium* nicht vorhanden. Hier wuchs *Coniophora* auf dem freien Agar genau so schnell wie auf der *Penicillium*-Kolonie. Liest man die Tab. 8 von oben nach unten, so sieht man, daß das Wachstum von *Coniophora* auf den *Penicillium*-Kolonien praktisch überall gleich war (die Differenz des Wachstums auf frischem und altem Pflaumensaft beruht wahrscheinlich auf verschiedenem Nährstoffgehalt und ist hier ohne Bedeutung); auf dem penicilliumfreien Substrat wurde nur auf oxydiertem Pflaumensaft und Malzagar die gleiche Wachstumsgeschwindigkeit wie auf *Penicillium* erreicht, auf dem unveränderten und neutralisierten Pflaumensaft aber blieb sie zurück. Der Pflaumensaft muß also einen Hemmungskfaktor enthalten, der weder durch Hitze bis zu 120° noch durch Neutralisieren oder durch langes Aufbewahren zerstört wird, dagegen durch Oxydation

¹ Die *Penicillium* spec. war aus einer Reihe von Probeansätzen wegen ihrer Eigenschaft, das Wachstum von *Coniophora* zu beschleunigen, isoliert worden. Die meisten *Penicillium*-Rassen zeigten diese Eigenschaft nicht.

und Bewuchs mit *Penicillium*, wodurch *Coniophora* ein besseres Wachstum ermöglicht wird. Daß es sich tatsächlich um eine Inaktivierung des Faktors handelt, zeigt die Tatsache, daß die Förderung des *Coniophorawachstums* bis zu 10 mm über die *Penicillium*-Kolonie hinaus reichte und auch nach Entfernung der Kolonie blieb. HARDER hat auch durch abgetötete *Penicillium*-Sporen, *Lycopodium*-Sporen und Watte, die er auf den Pflaumensaftagar brachte, Beschleunigung des *Coniophora*-Wachstums erhalten. Da *Coniophora* bei genügend hoher Luftfeuchtigkeit mit Leichtigkeit größere nährstofffreie Strecken überwächst (WEHMER 1915 wollte daran *Coniophora* von allen anderen Holzerstörern unterscheiden), war die Beschleunigung des *Coniophora*-Wachstums auf diesen besonderen Substraten wahrscheinlich eine Folge der vermiedenen Berührung mit dem Agar und damit auch mit dem Hemmstoff.

Die auf Pflaumensaftagar zu beobachtende Beschleunigung des *Coniophorawachstums* durch manche Pilze, Sporen usw. kommt somit wohl durch Ausschaltung eines im Pflaumensaft vorhandenen Hemmstoffes zustande.

C. Inaktivierung der Hemmstoffe.

1. Inaktivierung durch Oxydation, pH -Änderung und Cystein.

Mit Hilfe des Lochtestes wurde ermittelt, daß die Nährlösungen von *Xylaria*, *Panus* und *Pholiota* ihre wachstumshemmenden Wirkungen durch Oxydation mit H_2O_2 oder $KMnO_4$ verlieren¹.

Die Lösungen von *Merulius*, *Daedalea* und *Polyporus* verloren einen Teil ihrer Aktivität durch Neutralisieren mit KOH oder $CaCO_3$ (Stabilität von Hemmstoffen nur in bestimmtem pH -Bereich fanden z. B. auch CLARKE, JOHNSON und ROBINSON 1949; LUTZ 1948; OPPELMANN 1951; BOSE 1953). Bei Abstufung der pH -Werte ergab sich, daß *Merulius*-Lösung zwischen pH 5 und 6 und *Daedalea*-Lösung bei pH 5 an Wirksamkeit abnimmt². Durch erneutes Ansäuern trat keine Reaktivierung ein; offenbar wurde der empfindliche Teil des Hemmstoffes irreversibel zerstört. Außerdem muß ein zweiter, nicht durch Neutralisation zerstörbarer Hemmstoff in den Nährlösungen vorhanden sein. Die Aktivität der *Panus*- und *Pholiota*-Nährlösungen nahm beim Neutralisieren ebenfalls etwas ab, beim Ansäuern dagegen zu. Der Vorgang war reversibel und beliebig wiederholbar. Die Hemmwirkung (= Antibiotischer Quotient) einer *Panus*-Lösung im Lochtest bei verschiedenen pH -Werten zeigt Abb. 7.

Nach SCHRAUFSTÄTTER und DEUTSCH (1948) inaktiviert Cystein Substanzen mit ungesättigten Keto-Gruppen (nach MIESCHER 1950 wird z. B. Patulin durch Verbindungen mit SH-Gruppen inaktiviert). Von den vorliegenden Hemmstoffen ließ sich nur der in der *Xylarialösung* durch Cystein inaktivieren. Durch Zusatz

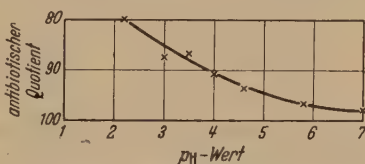


Abb. 7. Hemmwirkung (= antibiotischer Quotient) einer *Panus*-Nährlösung von verschiedenem pH -Wert im Lochtest gegen *Polystictus*.

¹ Ein Versuch, den *Xylaria*-Hemmstoff titrimetrisch zu bestimmen, hatte keinen Erfolg, da offensichtlich noch andere oxydable Substanzen vorlagen.

² Bei den pH -empfindlichen Hemmstoffen wurde häufig Oxydationsempfindlichkeit vorgetäuscht, da durch Oxydation der Oxalsäure der pH -Wert anstieg und die Aktivität dadurch sank. Bei Zugabe einiger Tropfen HCl blieb die Aktivität konstant.

von 0,31 mg/cm³ Cystein sank die Aktivität von 125 E/cm³ auf 22 E/cm³, ging durch weiteren Zusatz jedoch nicht völlig verloren. Bei noch höherer Konzentration des Cysteins wurde die Hemmung wieder stärker, da Cystein selber auf *Polystictus* hemmend wirkt (bei 10 mg/cm³ beträgt der antibiotische Quotient 83). Ob die Restaktivität der *Xylaria*-Nährlösung durch Überlagerung der Cystein- und Hemmstoffwirkung entsteht oder ob auch in der *Xylaria*-Lösung kein einheitlicher Hemmstoff vorliegt, muß offen bleiben. Da OPPERMANN (1951) in *Xylaria*-Nährlösungen 4–5 Wochen alter Kulturen einen Hemmstoff mit völlig anderen Eigenschaften als den hier untersuchten festgestellt hat, ist letzteres wahrscheinlich.

Die Untersuchungen zeigen, daß die wachstumshemmenden Wirkungen der zersetzten Nährlösungen je nach Art der darin enthaltenen Hemmstoffe durch oxydierende Substanzen, pH-Änderungen und auch bestimmte Aminosäuren sich ändern können.

2. Inaktivierung durch die Testpilze.

In den meisten Versuchen war die Hemmung des Pilzwachstums durch die zersetzten Nährlösungen nur vorübergehend. Die Hemmstoffe wurden also inaktiv oder die aufgepflanzten Testpilze dagegen

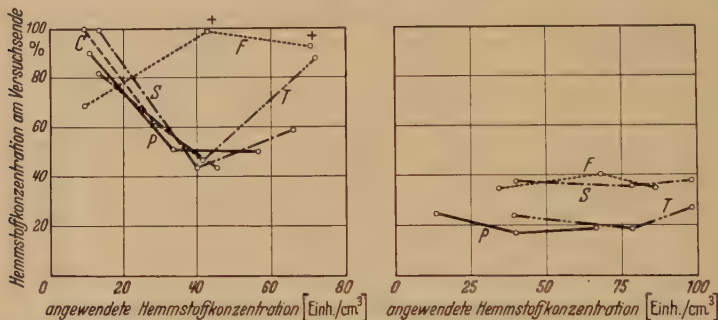


Abb. 8. Am Ende der Versuche mit *Merulius*- (links) und *Xylaria*-Lösungen (rechts) gemessene Hemmstoffkonzentrationen in Prozent der Ausgangskonzentrationen. Abszisse: Angewendete Konzentration. Die Werte sind aus Versuchen mit *Polystictus* (P), *Coniophora* (C), *Trametes* (T), *Fomes* (F) und *Schizophyllum* (S). (+ *Fomes* war durch 42 und 70 E/cm³ *Merulius*-Hemmstoff vor Versuchsende tot.)

resistent. Beides kommt nach Literaturangaben vor (z. B. Inaktivierung von Penicillin: FLEMMING 1946, IRRGANG, MÄRA u. SACHS 1950, POLLOCK 1950. Erwerbung von Resistenz gegen Streptomycin: KLEIN u. KIMMELMANN 1947, SEVAG u. ROSANOFF 1952; und gegen Aureomycin: GEZON u. FASAN 1950).

Zur Prüfung auf eventuell erworbene Resistenz wurde Mycel von *Polystictus* und *Fomes* sofort nach Beendigung des Versuches mit *Merulius*-Lösung auf eine Lochtestplatte geimpft und hier die Hemmung durch *Merulius*-Lösung mit unbehandeltem *Polystictus*- und *Fomes*-Mycel verglichen. Ein Hinweis, daß das Mycel im Versuch resistent geworden wäre, ergab sich nicht. Darum wurde in allen Kombinationen, in denen die Wirkung der von *Merulius*, *Daedalea*, *Polyporus* und *Xylaria* zersetzten Nährlösungen gemessen wurde, die Hemmstoffkonzentration außer bei Versuchsbeginn auch am Versuchsende im Lochtest bestimmt.

In vielen Fällen zeigte sich eine Abnahme der Hemmstoffkonzentration auf 50—20% während der Versuchszeit (Abb. 8). Beim *Xylaria*-Hemmstoff war der prozentuale Rest bei allen angewendeten Konzentrationen annähernd gleichgroß (b in Abb. 8). Bei den anderen dreien dagegen war er bei niedriger Hemmstoffkonzentration sehr hoch, betrug bei mittlerer nur noch etwa 50% und stieg bei hoher wieder an (Beispiel: *Merulius*-Hemmstoff, a in Abb. 8).

Zur Prüfung, ob die Testpilze Inaktivierungsfaktoren in die Nährlösung ausgeschieden, wurden die hemmstoffhaltigen Lösungen von *Merulius*- und *Xylaria*-Kulturen teils mit Nährlösung einer 36 Std alten *Schizophyllum*-Kultur, teils mit 7%iger Biomalzlösung im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Hemmstoffkonzentration wurde sofort und nach 48 Std (Aufbewahrung bei 25° C, je 10 cm³ in 100 cm³-Kolben) im Lochtest bestimmt.

Wie Tab. 9 zeigt, verlor die Mischung der *Xylaria*-Lösung mit Nährlösung der *Schizophyllum*-Kultur fast die Hälfte ihrer Aktivität. Die anderen Mischungen blieben dagegen unverändert.

Tabelle 9. Aktivitätsänderung von Lösungen mit *Merulius*- und *Xylaria*-Hemmstoff durch Mischung mit Malzlösung und Nährlösung einer 36 Std alten *Schizophyllum*kultur.

	<i>Xylaria</i> + Malzlösung	<i>Xylaria</i> + <i>Schizophyllum</i>	<i>Merulius</i> + <i>Schizophyllum</i>
0 Std; E/cm ³	85	85	87
48 Std; E/cm ³	80	47	90

Durch Bewuchs mit *Schizophyllum* muß in der Biomalzlösung also ein Faktor gebildet worden sein, der den *Xylaria*-Hemmstoff, aber nicht den *Merulius*-Hemmstoff inaktiviert.

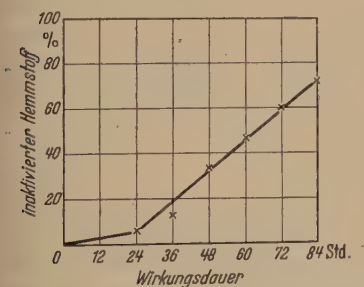


Abb. 9. Inaktivierung von *Xylaria*-Hemmstoff durch Mischung mit *Schizophyllum*-Nährlösung nach verschiedener Wirkungs-dauer (inaktivierte Menge in Prozent der Ausgangskonzentration).

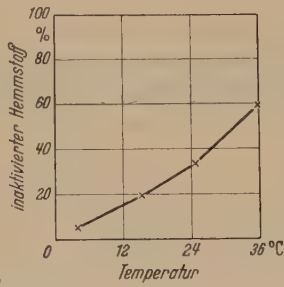


Abb. 10. Inaktivierung von *Xylaria*-Hemmstoff durch Mischung mit *Schizophyllum*-Nährlösung bei verschiedener Temperatur (inaktivierte Menge in Prozent der Ausgangskonzentration).

Es handelt sich vermutlich um eine enzymatische Reaktion, deren zeitlichen Verlauf Abb. 9 zeigt. Bei Bindung antibiotisch aktiver Gruppen des Moleküls durch Stoffwechselprodukte (BERKMAN, HENRY, HOUSEWRIGHT u. HENRY 1947; RYBAK u. GROS 1948) hätte die Reaktion bei der hohen Ausgangskonzentration von 85 E/cm³ sich einem Sättigungspunkt nähern müssen. Für einen enzymatischen Vorgang

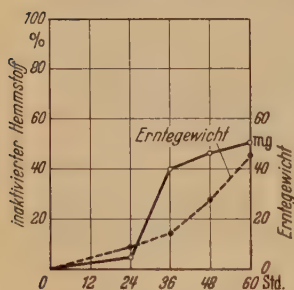
spricht weiter die Temperaturabhängigkeit (Abb. 10) mit einem $Q_{10} = 2$ (SUMNER u. SOMERS 1947; PRECHT 1949) sowie die teilweise bzw. völlige Zerstörung des Inaktivators durch Filtration und Erhitzen auf 100° .

Benutzt man die Menge des inaktivierten *Xylaria*-Hemmstoffes als Maß der Enzymkonzentration, so zeigt sich bei Pilzen mit schnellerem Wachstum auch die stärkere Enzyymbildung (Tab. 10).

Tabelle 10. Mycelgewicht und Konzentration des Inaktivierungsenzyms 48 Std alter Kulturen der Testpilze.

Testpilz:	<i>Fomes</i>	<i>Coniophora</i>	<i>Trametes</i>	<i>Poly-stictus</i>	<i>Schizo-phyllum</i>
Enzymkonzentr. (inakt. E/cm ³)	12	15	15	26	30
Mycelgewicht (mg)	6,8 ±0,2	10,2 ±0,4	14,2 ±0,5	17,3 ±0,3	27,2 ±0,6

Abb. 11 zeigt aber, daß die Bildung des Inaktivierungsenzyms nicht unmittelbar an das Wachstum gebunden ist, sondern daß es von einem bestimmten Kulturstadium an auftritt.



Die Bildung des Inaktivators durch alle 5 Testpilze sowie die Oxydationsempfindlichkeit des Hemmstoffes (Seite 341) ließen als inaktivierendes Enzym eine relativ unspezifische konstitutive Oxydase vermuten. Bei Prüfung 1—5 Tage alter Mycelstücke auf verschiedene Oxydasen

Abb. 11. Zeitliches Auftreten des Inaktivators bei *Schizophyllum*. (Inaktivierte E/cm³ in Prozent der Gesamtkonzentration.)

und Reduktase (Methodik Seite 323) ließ sich jedoch bei *Schizophyllum* und *Coniophora* keine Oxydase nachweisen (Tab. 11). Von den nachgewiesenen Enzymen konnte daher keines mit dem Inaktivator identisch sein. Es ist jedoch trotzdem möglich, daß die Inaktivierung auf oxy-

Tabelle 11. Enzyme der Testpilze.

Radius der Farbänderungszone des Lochtestes in Millimetern. In einigen Fällen stieg die Enzymkonzentration erst mit zunehmendem Alter auf den angegebenen Wert (Schrägstrich hinter der Zahl).

Indicator	<i>Polystictus</i>	<i>Trametes</i>	<i>Schizo-phyllum</i>	<i>Fomes</i>	<i>Coniophora</i>
Oxydasen:					
Jodstärke	—	4/	—	4/	—
Tyrosin	5/	3	—	5/	—
γ -Naphтол	2/	7	—	6	—
Tannin	5/	6	—	6	—
Reduktase:					
Indigokarmin	3/	3	—	2	—

dativem Wege erfolgt, jedoch handelt es sich dann um ein Enzym anderer Substratspezifität.

Bei Mischung der hemmstoffhaltigen Nährlösungen von *Merulius*, *Daedalea* und *Polyporus* mit Nährlösung 1—5 Tage alter Kulturen der Testpilze war nach 7 Tagen noch keine Aktivitätsabnahme im Lochtest nachweisbar. Dagegen nahm die Aktivität ab, wenn z. B. *Merulius*-Lösung einer *Coniophora*-Kultur zugesetzt wurde (Tab. 12).

Tabelle 12. Abnahme der Hemmwirkung einer *Merulius*-Lösung bei Zugabe zu einer *Coniophorakultur*.

Hemmstoffkonzentration in E/cm ³ :			
nach	0 Std	26	Kontrolle 26
	12 Std	25	
	24 Std	21	
	36 Std	14	
	48 Std	13	Kontrolle 28.

Da der Vorgang offensichtlich an die Gegenwart des Pilzes gebunden war, wurde nun der wirksame Faktor im Mycel selbst gesucht.

Die Testpilze wurden auf 50 cm³ 3,5%iger Biomalzlösung in 300 cm³-ERLENMEYER-Kolben 10 Tage kultiviert. Dann wurde die Nährlösung abfiltriert. Das Mycel wurde im Mörtel mit Quarzsand zerrieben, nach 10 min wurde von einem Teil des Breis der Auszug abfiltriert und gesondert untersucht. Alles geschah mit möglicher Sterilität. Eine *Merulius*-Lösung wurde auf 100 E/cm³ Hemmstoff eingestellt und mit den obigen Lösungen und Brei 1:1 gemischt. Alle Lösungen wurden auf ein p_H 2,8—3,0 eingestellt, um unter Umständen doch erfolgte Infektionen an der Entwicklung zu hindern und zugleich einen sicheren p_H-Bereich für den Lochtest zu schaffen, der nach einer Wirkungszeit von 48 Std (bei 25°) durchgeführt wurde. Vom Mycelbrei wurde dazu nur die überstehende Lösung verwendet.

Tabelle 13. Antibiotische Aktivität einer *Merulius*-Lösung nach Mischung mit Kulturlösung, *Mycelauszug* und *Mycelbrei* der Testpilze (Hemmstoffkonzentration in E/cm³).

Testpilz:	<i>Polystictus</i>		<i>Trametes</i>		<i>Schizophyllum</i>		<i>Fomes</i>		<i>Coniophora</i>	
	s	n	s	n	s	n	s	n	s	n
Kontrolle . . .	50	10	50	10	50	10	50	10	50	10
Nährlösung. . .	47		52		47		47		54	
Mycelauszug . .	52		43		54		50		48	
Mycelbrei . . .	30	12	30	10	33	9	30	12	40	12

s = saure Lösung, n = neutralisierte Lösung.

Wie aus Tab. 13 hervorgeht, befanden sich nur im Mycelbrei, dagegen nicht in der Nährlösung und auch nicht im Mycelauszug Faktoren, die den p_H-empfindlichen Anteil der *Merulius*-Hemmstoffe inaktivieren.

Die schon von HARDER (1911) und OPPERMANN (1951) vermutete Inaktivierung pilzlicher Hemmstoffe durch manche Basidiomyceten kann also sowohl durch aus der Nährlösung isolierbare als auch

an die Gegenwart des Mycels gebundene Faktoren erfolgen (Inaktivierung von *Xylaria*- bzw. *Merulius*-Hemmstoff).

IV. Besprechung der Ergebnisse.

Zahlreiche Autoren haben die Wirkungsweise sowohl der von gewissen Organismen gebildeten als auch von gänzlich fremden Stoffen auf Mikroorganismen untersucht (z. B. MONOD 1944; BERKMAN, HENRY, HOUSEWRIGHT u. HENRY 1947; RYBAK u. GROS 1948; FRIES 1950a; MANDELS u. SIU 1950; LETTRÉ u. ALBRECHTS 1951; CAFIFERO u. ZAMBRUNO 1952). Unter anderem hat YAMAMOTO (1933) ein Schema der Wirkung von Giften auf Wachstum und Atmung bei Schimmelpilzen entwickelt. Er unterscheidet *a* solche, die direkt die Atmung hemmen (der CO_2 -Koeffizient wird kleiner), *b* andere, die primär nur Wachstumsvorgänge hemmen (der CO_2 -Koeffizient wird größer) und *c* solche, die auf beides hemmend wirken (der CO_2 -Koeffizient bleibt unverändert). Dabei übersteigen Wachstum und Atmung niemals die Werte der giftfreien Kontrolle.

Versuchen wir die vorstehend geschilderten Beobachtungen über die Wirkungen gebrauchter Nährlösungen auf Wachstum und Atmung anderer Pilze nach diesem Schema einzuordnen, so zeigt sich sofort, daß sich in keiner Lösung ein reines Atmungsgift (also Gruppe *a*) befand, denn in den Kombinationen mit einer geringen Abnahme des CO_2 -Koeffizienten erfolgte gleichzeitig eine Förderung des Wachstums. Dagegen entsprechen die Seite 332 unter III zusammengefaßten Kombinationen der Gruppe *c* YAMAMOTOS und die unter I und II zusammengefaßten ungefähr der Gruppe *b*¹. In allen Fällen sind also primär mehr oder weniger spezifisch die Wachstumsvorgänge gehemmt worden. Auch das Sulfanilamido-thiazol gehört seiner Wirkung auf *Fomes* nach zur Gruppe *b*, wie die Sulfonamide ja auch bekannt sind als Antagonisten der *p*-Aminobenzoesäure (TSCHACHE 1947; AUHAGEN 1948; NIMMO-SMITH 1948; ANKER 1951) und an ihre Stelle bei Synthesen, vor allem der Folsäure und Enzymen der Eiweißsynthese (DE HAAN u. WINKLER 1951) treten. (SEVAG, HENRY u. RICHARDSON 1945 fanden dagegen durch Sulfonamide bei Bakterien eine Atmungshemmung.)

Die Seite 329 unter IAb und IBc, d u. e zusammengefaßten Gruppen fügen sich, wie schon erwähnt, nicht völlig dem Schema YAMAMOTOS, da hier die Atmung der auf normalem Nährboden wachsenden Kontrolle überschritten wurde, und auch für die Gruppe IAa erscheint die Ein-

¹ Sicher läßt sich eine strenge Abgrenzung der Gruppen *b* und *c* YAMAMOTOS nicht immer durchführen, denn Störungen z. B. der Eiweißsynthese werden auf vielfache Weise auch die Atmungsvorgänge in Mitleidenschaft ziehen, schon weil die Fermentträger meist Eiweiße sind.

ordnung bei dem hohen CO_2 -Koeffizienten fraglich. Berücksichtigt man jedoch, daß z. B. *Polystictus* Oxalsäure zu oxydieren vermag (auch von anderen Pilzen ist dies beschrieben worden: NORD u. VITUCCI 1951; ALLSOPP 1951), wobei bei nur geringem Energiegewinn große CO_2 -Mengen frei werden (Maltose 112 cal, Oxalsäure 30 cal je 1 Molekül CO_2), so vermag man die Wirkung der *Merulius*-Nährlösung durch Zusammenwirken von Wachstumshemmstoff und Oxalsäure recht gut zu erklären, wobei *Coniophora*, die selber Oxalsäure anreichert, bezeichnenderweise keinen solchen starken Anstieg des CO_2 -Koeffizienten zeigte. Die Lösungen von *Daedalea* und *Polyporus* steigerten die Atmung einiger Pilze jedoch über die der Kontrolle hinaus. Die schnelle Oxydation einer für diese Pilze nicht giftigen Säure würde auch dies erklären, und tatsächlich ist bei *Daedalea* und *Polyporus* die Oxalsäure nur ein Teil der gebildeten Säuren. — Es scheint somit nicht notwendig zu sein, die Atmungssteigerung auf die Antibiotica selbst zurückzuführen; dagegen muß den Säuren, besonders der Oxalsäure, eine starke Mitwirkung am Antagonismus der höheren Pilze, wie er sich im Mischtest zeigte, zugesprochen werden.

Auch indirekt wirken die Säuren auf die Testpilze durch Veränderung des pH -Wertes der Nährlösung, von dem z. T. die Aktivität der Antibiotica abhängig ist. So wirken die Nährlösungen von *Panus* und *Pholiota* im sauren Bereich sehr viel stärker hemmend als im neutralen. Die gleichen Verhältnisse fanden mehrere Autoren bei der Untersuchung der fungistatischen Wirkung höherer Fettsäuren (HOFFMAN, SCHWEITZER u. DALBY 1939; RIGLER u. GREATHOUSE 1940). RIGLER und GREATHOUSE schlossen aus diesem pH -Verhalten, daß das undissoziierte Molekül hemmt, das Ion dagegen nicht; das trifft sicher auch für den *Panus*- und *Pholiota*-Hemmstoff zu. Durch diese Eigenschaft läßt sich auch die starke Hemmung von *Coniophora* durch *Panus*- und *Pholiota*-Nährlösung erklären, die im Gegensatz zur sonstigen Resistenz von *Coniophora* steht. Weiterhin muß jede Verminderung der Acidität, wie sie z. B. durch *Polystictus* erfolgt, in der Nähe des Neutralpunktes zum Unwirksamwerden eines Teils der *Merulius*-, *Daedalea*- und *Polyporus*-Hemmstoffe führen, da diese nur in ziemlich saurer Lösung stabil sind. Solche Aktivitätsabnahme durch Neutralisieren stellte auch OFFERMANN (1951) fest, und vom Penicillin ist bekannt, daß es nur im neutralen und schwach sauren Bereich stabil ist (RÖMER 1947; CLARKE, JOHNSON u. ROBINSON 1949). Man nimmt an, daß die Inaktivierung beim Penicillin durch Sprengung des β -Lactamringes erfolgt (FLEMMING 1946; BRODERSEN 1949). Die irreversible Inaktivierung von *Merulius*-, *Daedalea*- und *Polyporus*-Hemmstoff beim Neutralisieren läßt vermuten, daß es sich auch hier um eine Strukturzerstörung an der wirksamen Gruppe handelt.

In unseren Versuchen erfolgte die Inaktivierung der Hemmstoffe jedoch auf andere Weise. So wurde der *Xylaria*-Hemmstoff durch ein Ectoenzym inaktiviert, wie es z. B. auch vom Penicillin (FLEMMING 1946; IRRGANG, MARA u. SACHS 1950) und Patulin (WALLHÄUSSER 1951 b) bekannt ist. Für das Verhalten in Mischkulturen ist jedoch nicht nur das mengenmäßige Auftreten des Enzyms wichtig, sondern auch das zeitliche. Junge Hyphen, an denen es noch nicht gebildet wird, werden vom *Xylaria*-Hemmstoff zunächst völlig gehemmt; nach einigen Tagen kann dann *Xylaria* trotzdem völlig überwachsen werden, wie es schon HARDER (1911) beobachtet hat. Nach WALLHÄUSSER (1951 b) erfolgt auch die Inaktivierung von Patulin nur in bestimmten Wachstumsphasen. — Die Inaktivierung der *Merulius*-, *Daedalea*- und *Polyporus*-Hemmstoffe erfolgte dagegen anscheinend durch einen adaptiven Faktor, der mit steigender Hemmstoffkonzentration zunächst in steigender Menge gebildet wird, bis die Schädigung durch den Hemmstoff so groß wird, daß es nicht mehr zur Ausbildung dieses Faktors kommt (a in Abb. 8). Der Versuch mit Mycelfraktionen steht in keinem Widerspruch dazu, da im Mycelbrei zweifellos noch eine große Anzahl intakter Zellen enthalten war.

Eine unmittelbare Folge der Inaktivierung ist die in vielen Kombinationen beobachtete Vergrößerung der Myceldichte. Bei Ausscheidung eines Enzyms, aber auch bei endogener Inaktivierung (IRRGANG, MARA u. SACHS 1950), muß es zum stärksten Hemmstoffabbau in der unmittelbaren Umgebung der Hyphen und damit zur Entstehung eines Konzentrationsgefälles kommen. Die Hyphen aber, die jetzt in die Lösung hineinwachsen, müssen gegen eine steigende Konzentration des Hemmstoffes anwachsen, während der Bildung von Luftmycel nur mechanische Grenzen gesetzt sind. Es erfolgte darum auch durch Sulfanilamido-thiazol, das sicher nicht enzymatisch inaktiviert wird, keine Erhöhung der Myceldichte bei *Fomes*.

In einigen Fällen war die Steigerung der Myceldichte jedoch eine Folge der durch geringe Mengen der zersetzten Nährlösungen geförderten Mycelbildung. Solche Wachstumsförderungen sind gerade im Zusammenhang mit antibiotischen Untersuchungen wiederholt beobachtet worden (NELIUS u. LAFONTAINE 1949; VIRTANEN 1949; WALLHÄUSSER 1951a; OPPERMAN 1951). FRIES (1949, 1950a, 1950b, 1951) hat bei Eumyceten Förderung des Wachstums vor allem in den ersten Kulturstadien durch spezifisch wirkende Aminosäuren und Purine erhalten. Da Aminosäuren außer in der Form von Antibiotica (CRAIG 1949; DALGLIESH u. JOHNSON 1950) auch sonst in der Nährlösung durch Mikroorganismen angereichert werden können (DUNLOP 1949; FROMAGEOT, JUSTISZ u. TESSIER 1949; DAGLEY, DAWES u. MORRISON 1950; GOODLOW, BRAUN u. MIKA 1951; MORTON 1951), wäre eine Wachstumsförderung hierdurch denkbar; doch kann es sich auch um andere Stoffe handeln.

Dagegen erfolgt die beschleunigte Ausbreitung des Mycels, wie sie *Coniophora* auf Pflaumensaftagar durch *Penicillium* ermöglicht wurde, offensichtlich nicht durch Zuführung eines fördernden Faktors sondern durch Ausschaltung eines hemmenden. Dies zeigt ebenfalls, daß die Beziehungen der Pilze nicht auf die Antibiose beschränkt sind und weiter, daß Fruchtsäfte und ähnliche Nährböden neben reichem Gehalt an Wachstumsfaktoren auch hemmende Faktoren enthalten können.

Das antagonistische Verhalten der Pilze, wie man es in Mischkulturen beobachtet, beruht also mindestens vorwiegend auf Hemmungen synthetischer Stoffwechselvorgänge und nicht auf Hemmung des Kohlenhydratabbaus. Für das Verhalten ist weiter die Menge der gebildeten Hemmstoffe wichtig, welcher Mycelteil sie bildet, und ihre chemischen Eigenschaften, und im Hinblick auf den Antagonisten die Empfindlichkeit gegen dessen Hemmstoffe, die Fähigkeit diese zu inaktivieren, die Schnelligkeit dieses Vorganges, welcher Mycelteil den Inaktivator bildet und vielleicht auch die Fähigkeit, dessen Stoffwechselprodukte und Enzyme für das eigene Wachstum auszunutzen.

Zusammenfassung.

6 Hymenomyceten (*Merulius lacrymans*, *Polyporus sulfureus*, *Daedalea quercina*, *Pholiota mutabilis*, *Panus conchatus* und *Lepiota cepaestipes*) und 1 Ascomycet (*Xylaria polymorpha*) wurden auf Biomalzlösung kultiviert; im Zeitpunkt des maximalen Hemmstoffgehaltes der Nährlösung (je nach Art nach 12 Tagen bis 5 Wochen) wurde deren Wirkung auf Wachstum und Atmung von 5 anderen Hymenomyceten (*Coniophora cerebella*, *Polystictus versicolor*, *Fomes fomentarius*, *Trametes radiciperda* und *Schizophyllum commune*) untersucht.

Das Wachstum wurde in fast allen Kombinationen gehemmt und zwar die Zunahme des Koloniedurchmessers meist stärker als die Zunahme der Mycelsubstanz. In einigen Fällen (20% der Gesamtversuche) wurde das Wachstum bei niedriger Konzentration aber auch gefördert. Bei *Xylaria*-Nährlösung ließ sich der fördernde Faktor vom Hemmstoff trennen.

Die Atmung wurde in einigen Fällen gleich stark wie das Wachstum gehemmt (28% der Versuche), in den meisten Kombinationen wurde sie jedoch weniger beeinträchtigt oder sogar, besonders durch die Lösungen von *Daedalea* und *Polyporus*, über die Atmung der Kontrolle (auf normaler Nährlösung) hinaus gesteigert.

Sulfanilamido-thiazol wirkte auf *Fomes* ebenfalls stärker wachstums- als atmungshemmend, während Streptomycin und Colchicin so gut wie unwirksam waren.

An der antibiotischen Aktivität der gebrauchten Nährlösungen waren durch die Pilze gebildete Säuren, vor allem Oxalsäure, mit beteiligt.

Die hemmende Wirkung einiger gebrauchter Lösungen ließ sich herabsetzen, und zwar durch Neutralisation (*Merulius*- und *Daedalea*-Lösung irreversibel, *Panus*- und *Pholiota*-Lösung reversibel), Oxydation (*Xylaria*-, *Panus*- und *Pholiota*-Lösung) und Cysteininzusatz (*Xylaria*-Lösung). Sie wurde weiterhin durch von den Testpilzen gebildete Faktoren herabgesetzt; diese wirkten gegen *Xylaria*-Hemmstoff exogen, während die gegen *Merulius*-, *Daedalea*- und *Polyporus*-Hemmstoff wirksamen anscheinend adaptiver Art waren.

In den Nährlösungen von *Xylaria*, *Panus* und *Pholiota* wurde Biotin nachgewiesen; dieses ist aber nicht mit den wachstumsfördernden Faktoren identisch.

Die Förderung der Mycelausbreitung von *Coniophora* in Mischkulturen mit *Penicillium* auf Pflaumensaftagar beruht dagegen nicht auf fördernden, sondern auf Ausschaltung von hemmenden Faktoren im Pflaumensaft.

Herrn Prof. Dr. HARDER möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für ihre Förderung meinen herzlichen Dank aussprechen.

Literatur.

- ALLSOPP, A.: J. exper. Bot. I, 71 (1950). — ANKER, W.: Mitt. naturforsch. Ges. Bern. NF 8, 55 (1951). — AUHAGEN, E.: Hoppe-Seylers Z. 283, 195 (1948). — BARNETT, H. L., and V. G. LILLY: Amer. J. Bot. 35, 297 (1948). — BAVENDAMM, W.: Zbl. Bakter. II, 76, 172 (1928); Erkennen, Nachweis und Kultur der holzzersetzenden und holzverfärbenden Pilze. Handb. der biol. Arbeitsmethoden Abt. 12 Teil 2, II. Spezielle Methoden Bd. 3. Berlin u. Wien 1939. — BAVENDAMM, W., u. U. REICHELT: Arch. f. Mikrobiol. 9, 486 (1938). — BEILER, A., u. E. SCHWARZ: Jb. wiss. Bot. 85, 355 (1937). — BERKMAN, S., R. J. HENRY, R. D. HOUSEWRIGHT and J. E. HENRY: J. Bact. 54, 6 (1947). — DE BOER, S. R.: Rec. Trav. Bot. Néerland. 25, 117 (1929). — BOSE, S. R.: Bull. bot. Soc. of Bengal, April 1947, 71; Arch. f. Mikrobiol. 18, 349 (1953). — BOTHE, FR.: Sitzber. Akad. Wiss. Wien. math.-nat. Kl. Abt. I 137, 595 (1928). — BRODERSEN, R.: Inaktivierung of Penicillin in aqueous solution. A reaction-kinetic investigation. Kopenhagen, Einar Munksgaard. Ref. in Ber. wiss. Biol. 68 (1950). — BRÜCKE, F., u. F. KAINDL: Wien. Z. innere Med. 28, 548 (1947). — BULLER, A. H. R.: Researches on Fungi Bd. V, 75. London, New York, Toronto 1933.
- CAFIFERO, M., u. D. ZAMBRUNO: Die Naturw. 39, 305 (1952). — CLARKE, H. T., J. R. JOHNSON and R. ROBINSON: The Chemistry of Penicillin. Princeton Univ. Press 1949. — COCHRANE, V. W.: Bull. Torr. bot. Club 77, 176 (1950). — COOK, A. H., and M. S. LACEY: Nature (Lond.) 3948, 790 (1945); zit. bei KAVANAGH (1947). — CRAIG, L. C.: Fortschr. chem. Forsch. 1, 312 (1949).
- DAGLEY, S., E. A. DAWES and G. A. MORRISON: J. Bact. 60, 369 (1950). — DAGLIESH, C. E., A. W. JOHNSON, A. R. TODD and L. C. VINNIG: J. chem. Soc. 2946 (1950), Ref. in Ber. wiss. Biol. 74 (1951). — DARBY, R. T., and D. R. GODDARD: Amer. J. Bot. 37, 379 (1950). — DULANEY, E. L., A. N. HODGES and D. PERLMAN: J. Bacter. 54, 1 Abstracts (1947). — DUNLOP, ST. G.: J. Bacter. 58, 457 (1949).

EMERSON, ST.: J. Bacter. **60**, 221 (1950).

FALCK, R.: Hausschwammforschungen **1**, Jena 1907. — FELDBACH, J.: Beih. Bot. Zbl. A **58**, 223 (1938). — FLEMMING, A.: Penicillin, its practical application. Butterworth & Co., London 1946. — FRIEDMANN, CH.: Z. Bot. **26**, 285 (1933). — FRIES, N.: Über die Bedeutung von Wuchsstoffen für das Wachstum verschiedener Pilze. Symbolae Botanicae Upsalienses **3** (1938); Sv. bot. Tidskr. **43**, 316 (1949); Physiol. Plant. **3**, 185 (1950a); Sv. bot. Tidskr. **44**, 379 (1950b); Nature **168**, 1045 (1951). — FRIES, N., u. A. PANDERS: Ark. Bot. Serie 2, Bd. **1**, Nr. 10, 437 (1950). — FROMAGEOT, CL.: Bull. Soc. Chim. biol. Paris **31**, 689 (1949).

GEORGE, M., and K. M. PANDALAI: J. Sci. and Industr. Res. **8**, 57 (1949), Ref. in Ber. wiss. Biol. **69** (1949). — GEZON, H. M., and D. M. FASAN: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **73**, 10 (1950). — GOODLOW, R. J., W. BRAUN u. L. A. MIKA: Arch. Biochem. **30**, 402 (1951).

DE HAAN, P. G., and K. C. WINKLER: Leeuwenhoek J. Microbiol. a. Serol. **17**, 107 (1951). — HARDER, R.: Naturwiss. Z. f. Forst- u. Landw. **9**, 129 (1911). — HARRISON, E., K. A. LEES and F. WOOD: Analyst (Lond.) **76**, 696 (1951). — HOFFMAN, C., T. R. SCHWEITZER and G. DALBY: Food Research **4**, 539 (1939).

IRRGANG, K., MÁRA u. SACHS: Z. f. Naturf. **5b**, 144 (1950). — JANDER u. PFUND (1934); zit. bei SCHMITZ, J. (1951).

KAVANAGH, F.: Adv. Encym. **7**, 461 (1947). — KAVANAGH, F., A. HERVEY and W. J. ROBBINS: Proc. nat. Acad. Sci. USA. **37**, 570 (1951). — KLEIN, M., and L. KIMMELMANN: J. Bacter. **54**, 363 (1947). — KLUYVER, A. J., u. L. H. C. PERQUIN: Biochem. Z. **266**, 68 (1933). — KÖGL, F., u. N. FRIES: Hoppe-Seylers Z. **249**, 93 (1937).

LETTRE, H., u. M. ALBRECHTS: Die Naturw. **38**, 547 (1951). — LITTMAN, M. L.: J. Bacter. **54**, 339 (1947). — LULLA, B. S.: Nature **163**, 489 (1949). — LUTZ, L.: Traité de Cryptogamie. Paris 1948.

MANDELS, G. R., and R. G. H. SIU: J. Bacter. **60**, 249 (1950). — MELIN, E.: Nature (Lond.) **4051**, 840 (1947). — MIESCHER, G.: Phytopath. Z. **16**, 369 (1950). — MONOD, J.: Ann. Inst. Pasteur. **70**, 381 (1944). — MORTON, A. G.: Nature **168**, 333 (1951). — MYERS, J., and L. B. CLARK: J. gen. Physiol. **28**, 103 (1944); zit. bei AACH, H. G.: Arch. Mikrobiol. **17**, 213 (1952).

NÉLIUS, P., and A. LAFONTAINE: C. r. Soc. Biol. **143**, 120 (1949); Ref. in Ber. wiss. Biol. **73** (1951). — NIMMO-SMITH, R. H., J. LASCELLES and D. D. WOOD: Brit. J. exper. Path. **29**, 264 (1948). — NORD, F. F., and J. C. VITUCCI: Arch. of Biochem. **14**, 229 (1954).

OPPERMANN, A.: Arch. Mikrobiol. **16**, 364 (1951).

PERLMAN, D.: Amer. J. Bot. **35**, 36 (1948); **36**, 180 (1949). — POLLOCK, M. R.: Brit. J. exper. Path. **31**, 739 (1950). — PRATT, R., and J. DUFRENOY: J. Bacter. **54**, 719 (1947). — PRECHT, H.: Z. Naturf. **4b**, 26 (1949). — PRICE, S. A.: Nature **161**, 20 (1948).

RIGLER, N. E., and G. A. GREATHOUSE: Amer. J. Bot. **27**, 701 (1940). — RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1952. — ROBBINS, W. J., F. KAVANAGH and H. HERVEY: Proc. nat. Acad. Sci. USA. **33**, 171, 176 (1947). — ROBBINS, H. J., D. G. SMITH and O. E. GRAESSLE: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **57**, 226 (1944). — RÖMER, K. H.: Das Antibioticum Penicillin. Berlin u. München: 1947. — RYBAK, B., u. F. GROS: Experimentia **4**, 396 (1948); Ref. in Ber. wiss. Biol. **69** (1949).

SCHMIDT, J.: Die organischen Säuren. In G. KLEIN: Handbuch der Pflanzenanalyse Bd. **2/1**, 362 (1932). — SCHMITZ, H.: Amer. J. Bot. **11**, 108 (1925). — SCHMITZ, J.: Planta **39**, 271 (1951). — SCHEFFER, T. C.: Plant Physiol. **11**, 535 (1936). — SCHEFFER, T. C., and B. E. LIVINGTON: Amer. J. Bot. **24**, 109 (1937). —

SCHRAUFSTÄTTER, E., u. S. DEUTSCH: Z. f. Naturf. **3b**, 163 (1948). — SCHOPFER, W. H., u. A. JUNG: Arch. Mikrobiol. **7**, 571 (1936). — SEVAG, MG., J. HENRY and R. A. RICHARDSON: J. Bacter. **49**, 129 (1945). — SEVAG, MG., and E. I. ROSANOFF: J. Bacter. **63**, 243 (1952). — SMITH, V. M.: Arch. of Biochem. **22**, 275 (1949). — SUMNERS, J. B., and SOMERS: Chemistry and methods of enzymes. New York 1947.

TAMIYA, J., u. S. YAMAGUTCHI: Acta phytochim. **7**, 43 (1933). — THEDEN, G.: Angewandte Bot. **23**, 189 (1941). — TSCHECHE, R.: Z. f. Naturf. **2b**, 10 (1947). — Arzneimittelforsch. **1**, 335 (1951). — TSCHECHE, R., K. SOEHRING u. K. HARDER: Z. f. Naturf. **2b**, 244 (1947).

VIRTANEN, C. E.: Suomen Kemistilehti Ser. B **22** (1949); Ref. in Ber. wiss. Biol. **71** (1952).

WAKSMAN, S. A.: Principles of Soil Microbiology. Baltimore 1927. — WALLHÄUSSER, K. H.: Arch. Mikrobiol. **16**, 201 (1951a); Die Naturw. **38**, 190 (1951b). — WASSINK, E. C.: Rec. Trav. bot. néerl. **31**, 583 (1934). — WEHMER, C.: Experimentelle Hausschwammstudien. Beiträge zur Kenntnis einheimischer Pilze Heft **3**. Jena 1915. — WEHMER, C. W., u. M. HADDERS: Systematische Verbreitung und Vorkommen der organischen Säuren. In G. KLEIN: Handbuch der Pflanzenanalyse Bd. **2/1**, 496 (1932). — WHINFIELD, B.: Ann. Bot. **12**, 111 (1948). — WIKÉN, T., u. H. SOMM: Experimentia **8**, 110 (1952). — WILKINS, W. H.: Trans. Brit. Mycol. Soc. **28**, 110 (1945); Brit. J. exper. Path. **27**, 140 (1946); Brit. J. exper. Path. **28**, 53 (1947a); **28**, 247 (1947b); **28**, 416 (1947c); **29**, 364 (1948); Ann. appl. Biol. **36**, 257 (1949). — WILKINS, W. H., and G. C. M. HARRIS: Ann. appl. Biol. **31**, 261 (1944). — WILKINS, W. H., and J. R. REES: Nature **166**, 944 (1950).

YAMAMOTO, A.: Acta phytochim. **7**, 65 (1933).

ZELLER, S. M., and H. SCHMITZ: Ann. of Miss. Bot. Garden **3**, 439 (1919). — ZYCHA, H.: Zbl. Bakter. II **97**, 222 (1937).

(Aus dem Strangeways Laboratory, Cambridge, England.)

Die Stellung der Grünen Bakterien im System der Organismen.

Von

E. G. PRINGSHEIM.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. Juni 1953.)

I. Die gegenwärtige Lage.

Eine Anzahl von Organismen, die in Gestalt und Größe Bakterien gleichen, besitzen in ihrem Protoplasma Pigmente, welche ihnen die Ausnützung der Sonnenenergie gestatten. Sie sind in zweierlei Hinsicht biologisch bemerkenswert: 1. weil sie einen biochemischen Vorgang unterhalten, dessen Vergleich mit der Photosynthese der Algen und höheren Pflanzen aufschlußreich ist, und 2. weil ihre verwandtschaftliche Beziehung zu den farblosen Bakterien für das Verständnis der Stammesgeschichte wichtig werden kann. Man kennt rote, braune und grüne Bakterien, deren Färbung bei ihrer Kleinheit allerdings oft nur erkannt werden kann, wenn sie gehäuft sind, die aber nicht mit solchen verwechselt werden dürfen, die gefärbte Substanzen abscheiden, selbst jedoch farblos sind.

Unsere Kenntnis der grünen Pigmentbakterien verdanken wir hauptsächlich VAN NIEL (1931, 1944), nachdem ENGELMANN (1882), WINOGRADSKY (1888), NADSON (1906, 1912), BUDER (1913), LAUTERBORN (1915), BAVENDAMM (1924) und andere wertvolle Vorarbeit getan hatten. Eine zusammenfassende Darstellung der Grünen Bakterien brachten GEITLER und PASCHER (1925, S. 451), die neben LAUTERBORNs Bezeichnung *Chlorobacteriaceen* für die ganze Gruppe „*Cyanochloridinae*“ vorschlugen, was vielleicht eine weitere Fassung bedeuten soll. Sie betonen, daß die Aufstellung einer taxonomischen Gruppe ein Provisorium darstelle, daß in keinem Falle die Bakteriennatur solcher Lebewesen erwiesen sei, und daß es sich wahrscheinlich um einzellige Cyanophyceen handle. „Ein späterer Stand der Forschung wird wohl die Cyanochloridinen-Chlorobakterien völlig in die einzelnen natürlichen Komponenten auflösen.“ Die Verf. erwarten von der Untersuchung der Pigmente wichtigen Aufschluß.

VAN NIEL (1931) hat dann als erster Grüne Bakterien reingezüchtet und ihre nahen Beziehungen zu den Purpur- und den Braunbakterien erörtert (1944), auf die schon LAUTERBORN (1915) auf Grund seiner morphologischen Untersuchungen aufmerksam gemacht hatte. In bezug auf die Pigmente scheint er sich aber auf BUDERS (1913) und dessen Schülers METZNER (1922) Untersuchungen verlassen zu haben. Auch die Arbeiten von FISCHER und STERN (1940, vgl. RABINOWITSCH 1945, S. 101, 402, 407 u. 445, obgleich die Literatur unvollständig berücksichtigt ist),

und von LARSEN (1952) haben die Lage nicht geklärt. VAN NIEL lehnt die Vorschläge von GEITLER und PASCHER ab, zieht viele von ihren Arten als Synonyme zusammen und stellt alle Grünen Bakterien in die Nähe der Purpurbakterien (vgl. auch VAN NIEL 1948).

Wie früher dargelegt (1949, S. 78), gibt es Mikroorganismen von der Gestalt und Größe von Bakterien, welche bläulich grün sind und andere mit einem gelbgrünen Ton. Die ersteren wurden in die Cyanophyceen, die letzteren in die Nähe der Purpurbakterien eingereiht. Ob es noch eine dritte Gruppe gäbe, die sich z. T. mit GEITLER und PASCHERS *Cyanochloridinae* decke, blieb ungewiß. Die neueren Untersuchungen von LARSEN (1952) erweitern unsere Kenntnis der Ernährungsbedingungen mit Hilfe einer neuen *Chlorobium*-Art, zeigen aber noch deutlicher, daß es nötig sein wird, viele Stämme zu untersuchen, um die morphologisch-taxonomische Lage zu klären.

II. Untersuchungsmethoden.

1. Kultur.

A. Blaugrüne „Bakterien“.

Unter den von GEITLER und PASCHER angeführten bakteroiden freilebenden Arten wird *Tetrachloris inconstans* (PASCHER, S. 456) als ganz zart blaß gelbgrün beschrieben. Eine ähnliche Form, die allerdings keine Vierergruppen, sondern nur Zellenpaare zeigte, wurde im Dezember 1948 in Gemeinschaft mit *Holopedia geminata* Lagerh. in einer Schlammprobe gefunden und konnte in Erde-Wasser-Röhrchen (PRINGSHEIM 1946a, 1946b) gezüchtet werden. Oft entstand ein hell blaugrüner Satz, und auch die Erde hinter dem Glas wurde auf der Lichtseite blaugrün. In alten Kulturen sahen die Zellansammlungen gelblich aus wie bei vielen Cyanophyceen, und die einzelnen Zellen farblos, während sie in frischen Kulturen eben erkennbar grünlich bläulich waren. Sie hatten einen Durchmesser von 1,0—1,3 μ und konnten vor der Teilung 2—2,4 μ lang werden. *Tetrachloris inconstans* ist 1,5 μ , manchmal größer im Durchmesser. Die Bestimmung der uns vorliegenden Form ist zweifelhaft. Am Rande des Hängetropfens konnten träge, unterbrochene Eigenbewegungen festgestellt werden (PRINGSHEIM 1949, S. 60). In Reagensglaskulturen entstand ein blaugrüner Streifen an der vom Fenster abgekehrten Seite, wohin die Zellen durch Kriechen gekommen sein dürften.

Ein anderer in Kultur angereicherter Organismus ähnelte in seiner Gestalt LAUTERBORN'S (1915, S. 430) *Pelagloea*, für die keine Farbe angegeben ist. Diese Art wurde mehrfach in Schlamm aus schmutzigen Gräben angetroffen und vermehrte sich in Erde-Wasser-Kulturen reichlich, besonders wenn Ammoniummagnesiumphosphat zugesetzt wurde.

Die Flüssigkeit wurde intensiv blaugrün. Die Zellen, die kurze Stäbchen darstellten und zuweilen kurze, unregelmäßige Ketten bildeten, zeigten eine eben noch erkennbare Färbung. Alte Kulturen bleichten aus. Bewegung wurde nicht beobachtet. Die Zellen sind meist $1,5-1,8:1\ \mu$ groß, können aber auch länger werden.

Eine dritte Form, ebenfalls aus einer Rohkultur mit Faulschlamm, war nur $0,6-0,8\ \mu$ dick und bildete ziemlich regelmäßige $1,2-1,5\ \mu$ lange Stäbchen. Trotz ihrer Kleinheit zeigten die Zellen auch einzeln deutliche Färbung, mußten also viel Pigment enthalten. In guten Kulturen war die Flüssigkeit tief blaugrün und hatte eine reinere Färbung als bei der vorigen Form. In älteren Kulturen entstand ein Satz, dessen oberste Schicht allmählich vergilbte, bis zuletzt die ganze Zellmasse verfärbt war. Durch Zusatz von Nährlösung konnte die blaugrüne Farbe wiederhergestellt werden. Diese Form soll provisorisch *Chroobacter vantiqhemii* heißen.

Vielleicht ist keine der drei verwendeten Arten genügend definiert. Es gibt sicher eine Menge mehr oder weniger ähnlicher Organismen, die ohne Kulturen der Aufmerksamkeit entgehen würden. Auch wurde keine von ihnen in Reinkultur gebracht, da sie sich in und auf Agarplatten und in Schüttelkulturen mit verschiedenen Nährböden nicht vermehrten. In starkem Licht traten Assimilationsgasblasen auf. Alle drei Arten enthielten Chlorophyll *a* und einen wasserlöslichen blauen Farbstoff, sind also Cyanophyceen.

B. Gelbgrüne Bakterien.

Das Material für die Untersuchungen stammte wieder aus verschiedenen, durch hineingefallene Blätter und Abwässer verunreinigten Gräben in Cambridge. Besonders wenn schwarzer Faulschlamm vorhanden ist und beim Aufrühren ein Geruch von Schwefelwasserstoff bemerkbar wird, ist man ziemlich sicher, gelbgrüne Bakterien neben Schwefelpurpurbakterien, Spirillen, *Beggiatoa*, *Thiothrix* und *Sphaerotilus* zu finden. Das ist hier in Cambridge im Herbst, Winter und Vorfrühling der Fall, da die Gräben selten zufrieren.

So wurde unter anderem in einem Röhrchen mit einer Spur Stärke, darüber toniger Erde und Wasser, das nach dem Pasteurisieren mit etwas Schlamm versetzt und künstlich beleuchtet worden war, nach drei Wochen über der Erde eine durchscheinende gelbe Färbung bemerkt. Nach weiteren drei Tagen war sie olivgrün, im auffallenden Licht tief blaugrün, von winzigen Stäbchen, die $2,5-6:0,4\ \mu$ groß waren, einzeln keine Färbung erkennen ließen und in einer sehr zerfließlichen Gallerte eingebettet waren. Keine der bisher beschriebenen Chlorobakterien ist so klein. Es wird deshalb der Name *Microchloris nadsonii* nov. gen., nov. spec. für diese ausgesprochen bakterienartige Form vorgeschlagen.

Dieser Organismus war leicht von Algen zu trennen, nicht aber von Chromatien und roten Spirillen. Durch ein Verdünnungsverfahren gelang schließlich auch das. Schon nach 3—4 Tagen zeigte sich bei guter Belichtung eine gelbe, klare Wolke über der Erde von Faulkulturen mit Stückchen Käse, mit Getreidekörnern oder Stärke. Eine Reinkultur wurde trotz mehrfacher Bemühungen nicht erzielt. Durch Verwendung von, bis zum Schraubdeckel gefüllten Halbliterflaschen konnte aber genug von anderen pigmentierten Organismen freies Material für die Chlorophyllbestimmung gewonnen werden, die Bacteriochlorophyll und nur dieses ergab. Zum Vergleich wurden Kulturen von Purpurspirillen verwendet, sowie eine von H. LARSEN im Laboratorium von VAN NIEL (Hopkins Marine Station, Pacific Grove, Californien) hergestellte Reinkultur von *Chlorobium thiosulfatophilum* Larsen (1952). Beide ergaben dasselbe Bacteriochlorophyll.

In den mit Faulschlamm beimpften Kulturen trat auch *Chlorochromatium aggregatum* Lauterborn (1915, S. 432) auf, manchmal sehr reichlich, und konnte monatelang in Tochterkulturen fortgeführt werden. Die Größe der Syncyanosen schwankte in weiten Grenzen, so daß erhebliche Unterschiede (GEITLER u. PASCHER 1925, S. 460) wohl nicht vorliegen; doch gelangen Klonkulturen nicht. Die äußeren Zellen sind deutlich gelbgrün. Die innere, die als farblos beschrieben wird, könnte ein schwach pigmentiertes Purpurbakterium sein, z. B. *Rhabdochromatium*, das eine ähnliche Gestalt hat. Eine sichere Entscheidung war nicht möglich; aber die von BUDER (1913, S. 82) beobachtete Lichtreizbarkeit spricht vielleicht in diesem Sinne. Die für eine ähnliche Form von PASCHER (GEITLER u. PASCHER, 1925, S. 460) beschriebenen dichten gelbgrünen Wolken „mit einem Stich ins Blaugrüne“ waren wohl blaugrün gegen einen dunklen Hintergrund, da sonst das Farbenspiel einen Widerspruch in sich darstellen würde. METZNER (1922) spricht von gelbgrüner Färbung im durchfallenden, schmutzig grüner im auffallenden Licht. Das entspricht ungefähr unseren Beobachtungen. Allerdings wären die Farben besser als ein leicht grünliches Gelb und ein bläuliches Schwarzgrün zu bezeichnen. Auffallend ist die Durchsichtigkeit selbst reichlicher Ansammlungen gegen das Licht, ebenso wie bei *Microchloris*.

Eine Farbstoffanalyse von *Chlorochromatium* konnte nicht unternommen werden, weil in Massenkulturen immer wieder andere pigmentierte Bakterien beigemischt waren.

2. Bestimmung des grünen Farbstoffes.

ENGELMANN (1888) hat als erster Absorptionskurven von roten Schwefelbakterien gewonnen (siehe auch BUDER 1919). Seine Präparate ließen die Hauptabsorptionsbande von Bacteriochlorophyll im Ultrarot um 800 $m\mu$ erkennen. Die Konstitution des Bacteriochlorophylls a konnten

HANS FISCHER u. Mitarb. ermitteln, so daß kein Zweifel besteht, daß die Purpurbakterien einen von Chlorophyll *a* und Chlorophyll *b* verschiedenen dritten Chlorophyllfarbstoff enthalten. Die im Heidelberger Botanischen Institut unter Leitung von Prof. A. SEYBOLD ausgeführten Chlorophyllbestimmungen hatten zur Aufgabe, die Natur der grünen Farbstoffe in gelbgrünen Bakterien aufzuklären. Die chromatographische Analyse frischer Kulturen von Purpurbakterien (SEYBOLD u. EGLE 1939) hatte gezeigt, daß das Bacteriochlorophyll ein azurblauer Farbstoff ist, der durch mehrere Carotinoide überdeckt wird. Da nur in manchen, aber nicht in allen chromatographischen Analysen neben Bacteriochlorophyll *a* noch zwei andere „grüne Komponenten“ auftraten, lag schon damals der Verdacht nahe, daß es sich um Derivate (wahrscheinlich Abbauprodukte) des Bacteriochlorophylls *a* handelte.

Offen blieb die Frage, welches Chlorophyll bei den „Grünen Bakterien“ vorliegt; ihre Beantwortung war nur mit Hilfe von Kulturen möglich. METZNER (1922) gab ein Bandenspektrum von Grünen Bakterien wieder, das von einer Purpurbakterienkultur stammte, in der sich „Chlorobakterien in genügender Reinheit“ entwickelt hatten. Dieses Spektrum zeigte weder mit Chlorophyll *a* noch mit Chlorophyll *b* Übereinstimmung, geschweige denn mit Bacteriochlorophyll *a*, so daß es damals berechtigt erschien, von einem besonderen Farbstoff, Bacterioviridin, zu sprechen. Die Existenz des Bacterioviridins, die sich nur auf das von METZNER angegebene Bandenspektrum stützte, war für die Systematik der Bakterien ebenso bedeutend wie für Probleme der Biochemie der Chlorophyllfarbstoffe und der Photosynthese überhaupt.

Ohne hier auf Einzelheiten einzugehen, darf gesagt werden, daß in den Grünen Bakterien *Microchloris nadsonii* und *Chlorobium thiosulfatophilum* neben verschiedenen, zunächst nicht bestimmbareren Carotinoiden nur Bacteriochlorophyll *a* vorhanden ist. Messungen mit dem BECKMANN-Spektrophotometer lieferten den Beweis, daß *in vivo*, also im Holochrom (SMITH 1952), nur Bacteriochlorophyll *a* festzustellen ist. Die Chromatographie (Puderzucker als Adsorbens) zeigte ebenfalls nur Bacteriochlorophyll und Abbauprodukte dieses Pigmentes, die entweder von abgestorbenen Individuen herrühren oder, trotz dem schonenden und kurzfristigen Analysengang, Artefakte sind — Bacterioviridin gibt es nicht! Das von METZNER wiedergegebene Absorptionsspektrum ist nicht für die lebenden Grünen Bakterien gültig, sondern kann höchstens Hinweise auf nicht näher definierbare Abbauprodukte des Bacteriochlorophylls geben.

Das Botanische Institut der Universität Heidelberg wird in absehbarer Zeit die mit meinen Kulturen gewonnenen Ergebnisse der Pigmentanalysen veröffentlichen.

III. Schlußfolgerungen.

Der Nachweis, daß die Chlorobacteriaceen dasselbe grüne, chlorophyll-ähnliche Pigment enthalten wie die Purpur- und Braunbakterien, vereinfacht die Lage ungemein, sowohl in physiologischer, wie in taxonomischer Hinsicht. Es wäre wünschenswert, daß das Pigmentsystem der Grünen Bakterien chemisch und auf seine photochemische Leistung hin näher untersucht würde. Obgleich es nicht bekannt ist, wie viele und welche Pigmente die Grünen Bakterien enthalten, so ist es doch wahrscheinlich, daß die Verhältnisse einfacher liegen als bei den Purpurbakterien. Dazu kommt die Feststellung, daß es winzige, bacteroide Cyanophyceen gibt.

PASCHER (GEITLER u. PASCHER 1925, S. 452) „faßt die Cyanochloridinae als Seitenzweige verschiedener Cyanophyceen auf, die Phykocyan nur noch in geringem Maße oder nicht ausbilden, so daß der Farbenton schließlich nur mehr von den Chlorophyllfarbstoffen der Cyanophyceen — und von den Karotenen gebildet wird“. Der blaugrüne Stich größerer Anhäufungen wird einem Gehalt an Phykocyan zugeschrieben, und es wird darauf hingewiesen, daß „die gelb- und fahlgrünen Formen durch alle Übergänge mit deutlich blaugrünen Typen verbunden sind“.

Die Verwechselung von durch Nahrungsmangel vergilbten (MAGNUS u. SCHINDLER 1912; PRINGSHEIM 1913; BORESCH 1913) mit stets gelbgrünen Arten war schwer zu vermeiden und kann nur durch Kulturversuche umgangen werden. Die Unterscheidung von kleinen Cyanophyceen und Chlorobakterien durch die Farbe (GEITLER 1925, S. 51) ist nicht immer sicher. Jedoch werden *Chlorochromatium*, *Chlorobium* und *Microchloris* nie blaugrün, während *Tetrachloris*, *Pelagloea* und *Chroobacter* im gesunden Zustand blaugrün sind, und nur bei Mangel fahlgelb, wenn auch nicht richtig gelbgrün werden.

In diesem Zusammenhang erwähnen GEITLER und PASCHER (1925, S. 452) auch „richtig gehende Cyanophyceen mit morphologisch sehr charakteristischer Gestalt, die ebenfalls dieselben gelbgrünen Töne haben wie die Cyanochloridinen-Chlorobakterien“, worauf übrigens schon LAUTERBORN (1915, S. 426) aufmerksam gemacht hatte. Er hatte hinzugefügt: „... wobei ich allerdings meine Zweifel nicht unterdrücken kann, ob diese gelbgrünen Fäden — echte Oscillarien sind. Eine sichere Entscheidung dürfte wohl eine mikrochemische und spektroskopische Untersuchung des Farbstoffes ergeben, die hoffentlich nicht lange ausstehen wird.“ Eine solche gelbgrüne Art ist *Oscillatoria chlorina* Kützing (GEITLER 1925, S. 361). Sie wurde aus Faulschlamm herausgezüchtet und fand sich in Anreicherungskulturen in den tieferen Schichten, wo wenig Sauerstoff eindringt, in schwebenden Trichomen, die in eine Capillarpipette eingesaugt und auf diese Weise von anderen Algen getrennt werden konnten. In Erde-Wasser-Kulturen (PRINGSHEIM 1946a, 1946b)

mit etwas organischer Substanz am Boden vermehrten sie sich gut und behielten stets eine frisch gelbgrüne Farbe. Die für die Art kennzeichnende Querstreifung war deutlich. Im Dunkelfeld erschienen die Fäden gelblich. Blauglanz (GICKLHORN 1921) war nicht zu sehen.

Oscillatoria chlorina enthält, im Gegensatz zu Chlorobacteriaceen, nur Chlorophyll a wie andere Cyanophyceen, kein Bacteriochlorophyll. Trotz sehr ähnlicher Farbe und dem gleichen Standort ist das Pigmentsystem also ganz verschieden. Die ökologische Gemeinschaft geht dabei sehr weit, wie Beobachtungen am Standort und an Kulturen zeigen. Auffallend ist allerdings das Ergebnis einiger Färbungen. Während *Oscillatoria chlorina*, gleich anderen fädigen Cyanophyceen, grampositiv ist und sich, nach Oxydation mit Perjodsäure, mit SCHIFFS Reagens rot färbt, verhalten sich die bakteroiden Cyanophyceen, ebenso wie die Chlorobakterien gegenüber beiden Färbungen negativ. Mit Salzsäure wird *Microchloris* in Massen bläulich, *Oscillatoria chlorina* auch einzeln. Diese Färbung ist aber schwach. Der Gehalt an Carotinoiden scheint nicht hoch zu sein.

Für die Stellung der Chlorobacteriaceen im System ist es weiterhin bedeutungsvoll, daß sie nicht nur ökologisch-physiologisch und im Chlorophyll mit den Purpurbakterien übereinstimmen, sondern daß es auch morphologische Anklänge gibt.

LAUTERBORN (1915, S. 427) stellte eine Übersicht über die Ähnlichkeiten in der Koloniebildung zwischen farblosen Bakterien und roten, blaugrünen und gelbgrünen Mikroorganismen zusammen. Die Parallele zwischen der farblosen *Lamprospedia*, der roten *Thiopedia* und der blaugrünen *Merismopedia*, die alle einschichtige Platten von rundlichen, sich abwechselnd in zwei aufeinander senkrechten Richtungen teilenden Zellen darstellen, ist zwar in die Augen fallend, sollte aber nicht überschätzt werden. Plattenverbände von Zellen kommen auch anderswo vor und sind nicht besonders spezifisch. Außerdem sind die Bewegungserscheinungen verschieden. *Lamprospedia hyalina* Schroeter 1886 ist, wie Reinkulturen von einem Material aus einer schmutzigen Bauernhofpfütze zeigten, identisch mit der geißelbeweglichen *Pedioplana haeckeli* Wolf 1901. *Thiopedia rosea* Winogradsky 1888 (S. 85, Photographie in PRINGSHEIM 1932, S. 481) ist bewegungslos, während *Merismopedia* eine gleitende, wackelnde Bewegung zeigt (NIKLITSCHKE 1934, S. 212, Brief von Dr. J. W. G. LUND und eigene Beobachtungen), ganz wie andere Chroococcaceen (PRINGSHEIM 1949, S. 60). Dagegen scheinen andere Ähnlichkeiten von größerer Bedeutung zu sein. *Thiodictyon elegans* WINOGRADSKY 1888 und *Pelodictyon lauterbornii* GEITLER 1925 bilden Netze von Stäbchen, die ersteren rot, die letzteren gelbgrün. Vergleichbar sind auch das rote *Pelochromatium roseum* Lauterborn 1915 und das gelbgrüne *Chlorochromatium aggregatum* Lauterborn 1913, deren Stäbchen

Längsreihen um eine endbegeißelte Bakterienzelle bilden. Biologisch und morphologisch ähnliche Aggregate von bräunlicher Farbe sind von UTERMÖHL (1924? nach GEITLER u. PASCHER 1925 ohne Zitat) beobachtet worden. Diese Parallelen werden besser verständlich, wenn man eine nahe Verwandtschaft zwischen roten, braunen und grünen Bakterien annimmt, die durch unsere Ergebnisse wahrscheinlich gemacht wird. Nach DANGEARD (1895; vgl. auch BENECKE 1912, S. 243, ohne Zitat) soll es sogar auch begeißelte grüne Spirillen geben. Geißelbewegliche grüne Bakterien sind sonst nur von CZURDA und MARESCH (1937) beschrieben worden.

Man hat wohl angenommen, daß grüne Bakterien Sauerstoff für die Oxydation von Schwefelwasserstoff durch Schwefelbakterien liefern können. Freier Sauerstoff wird jedoch von Chlorobacteriaceen ebenso wenig wie von Purpurbakterien gebildet, so daß die Wechselbeziehungen, falls sie bestehen, anderer Natur sein müssen, während bacterioide Cyanophyceen natürlich durch Sauerstoffproduktion ökologisch wichtig werden können.

VAN NIEL (1944, S. 80ff.) erörtert die Möglichkeit, daß Bakterien ohne Pigmente von solchen mit Pigmenten abstammen, so wie farblose Flagellaten von chlorophyllhaltigen. Diese Möglichkeit leuchtet mehr ein als die Abstammung farbloser Bakterien von Cyanophyceen (STANIER u. VAN NIEL 1941, S. 450; PRINGSHEIM 1949, S. 61). Chlorobakterien könnten ganz ebenso wie Purpurbakterien durch Pigmentverlust zu farblosen Bakterien werden und, wenn Geißelbeweglichkeit besteht, z. B. zu Pseudomonadaceen.

Wir stehen erst am Beginn der Erforschung der Chlorobacteriaceen. Weitere physiologische und morphologische Studien sind erwünscht. So ist z. B. die Vielgestaltigkeit von VAN NIELS *Chlorobium limicola* erstaunlich und wird von *Chlorobium thiosulfatophilum* Larsen (1952, S. 190) nicht wiederholt. Beide sind in Reinkultur verglichen worden. Soll man an die Möglichkeit denken, daß eine Reinzüchtung, d. h. Trennung von ungefärbten Bakterien, nicht unbedingt zu einer Klonkultur führen muß? Jedenfalls zeigen LARSENS Beobachtungen, ebenso wie die von CZURDA und MARESCH (1937), daß im Gegensatz zu VAN NIELS (1931, S. 72) ursprünglicher Auffassung eine ganze Anzahl von Arten bestehen (vgl. auch VAN NIEL 1948, S. 869).

Die Beziehung der Chlorobacteriaceen zu den Purpurbakterien und damit ihre Stellung im System wird nun klarer. VAN NIEL hat sich durch sein Vertrauen in die älteren Pigmentanalysen irreleiten lassen. Er sagt (1944, S. 61): „The green sulfur bacteria contain a chlorophyll which is most certainly not identical with either bacteriochlorophyll or chlorophylls *a* and *b*.“ Trotzdem hatte er den richtigen Instinkt, in seiner Bearbeitung des Systems (in Bergeys Manual 1948, S. 104) die Chloro-

bacteriaceen als Familie neben den Thiorhodaceen und Athiorhodaceen in die Subordo *Rhodobacteriineae* Breed, Murray and Hitchens (ohne Jahr und Literaturhinweis) zu stellen. Da die Chlorobacteriaceen nicht rot sind, erscheint das jedoch nicht ganz logisch. Die Bezeichnung *Chlorobacteriaceae* ist auch in ihrer Entstehung nicht sehr klar. Sie wurde (LAUTERBORN 1913) vor dem Gattungsnamen *Chlorobacterium* (LAUTERBORN 1915, S. 429) publiziert, von dem sie nach den Nomenklaturregeln abgeleitet werden muß (Intern. Bull. Bact. Nomenclature, 1,1 1951), von GEITLER und PASCHER (1925) ohne Autorennennung angenommen und mit einem Bindestrich mit ihrer neuen Bezeichnung *Cyanochloridinae* verbunden, deren taxonomischer Rang nicht ersichtlich ist. Dazu ist es unbekannt, ob *Chlorobacterium symbioticum* Lauterborn, der Typus der Familie, überhaupt zu den Chlorobacteriaceen gehört, da es fast nur durch sein symbiontisches Verhalten gekennzeichnet ist. Die bekannten Mitglieder der Familie sind an sauerstoffarme Standorte gebunden, was für die mit Chlorobakterien behafteten Organismen nicht zu gelten scheint. VAN NIEL (1944, S. 869) betont mit Recht die Unsicherheit der sechs von ihm aufgezählten Gattungen und betrachtet die bestuntersuchte unter ihnen, *Chlorobium* (VAN NIEL 1931, S. 65 ff.), als den Typus der Familie.

Die Verwandtschaft der meisten Purpurbakterien und von *Chloropseudomonas* (CZURDA und MARESCH 1937) mit den *Pseudomonadales*, zu denen auch die echten farblosen Schwefelbakterien (nicht aber die schwefelführenden farblosen Cyanophyceen, vgl. PRINGSHEIM 1949, S. 61 ff.) gehören, scheint wahrscheinlich (VAN NIEL 1944, S. 81; PRINGSHEIM 1949, S. 81). Vorläufig aber ist es zweckmäßig, die Pigmentbakterien zusammenzuhalten, für die die Ordnung CHLOROBACTERIALES mit den Familien *Thiorhodaceae* Molisch, *Athiorhodaceae* Molisch und *Chlorobacteriaceae* Lauterborn vorgeschlagen wird. Die hierher gehörigen Bakterien haben alle daselbe chlorophyllartige Pigment Bacteriochlorophyll und die Fähigkeit, mit seiner Hilfe die Lichtenergie ohne Produktion freien Sauerstoffes auszunützen.

Diagnose.

Chroobacter vantieghemi nov. gen., nov. spec. (*Chroococcales*, *Cyanophyceae-Myxophyceae*). Stäbchen von 0,6—0,8 μ Dicke und 1,2—1,5 μ Länge, nicht in Gallerte eingebettet. Bei der Teilung schnüren sich die Stäbchen ein, so daß Doppelkokken entstehen. Keine Kettenbildung. In dichter Anhäufung in Kulturen tief blaugrün, beim Altern vergilbend. Einzelne Zellen deutlich gefärbt. Keine Eigenbewegung (Abb. 1).

Tetrachloris diplococcus nov. spec. Kügelchen von 1,2—1,4 μ Durchmesser und Doppelkokken von 2—2,4 μ Länge, nicht in Gallerte eingebettet. Provisorisch zu PASCHERS Gattung *Tetrachloris* (GEITLER u. PASCHER 1925, S. 455—56) gestellt, obgleich deren Zellen als „ganz zart blaß-gelbgrün“ beschrieben werden, eine Färbung, die die neue Art erst bei Erschöpfung der Nährstoffe annimmt,

während frische Zellen bläulichgrün aussehen. Größere Ansammlungen von Zellen am Boden der Kulturflüssigkeit blaugrün.

Unterschied gegen *T. inconstans* Pascher: Zellen kleiner, viele Doppelzellen, keine Vierergruppen (Abb. 2).

Diese Art ist eine *Chroococcaceae*.

Pelagloea chlorina Lauterborn 1915 (S. 430) revid. Die Bestimmung ist nicht sicher, da unser Organismus blaugrün ist, während LAUTERBORN für seine Art keine Farbe angibt, so daß sie vielleicht gelbgrün gewesen sein kann. Auch bildete unsere Form zwar Zellreihen, aber keine regelmäßigen Ketten, und die Schleimbildung war gering.

Zellen 1μ dick, $2,5-8\mu$ lang, genau wie bei LAUTERBORN. Sie sehen wie Bakterienstäbchen aus und erscheinen einzeln eben erkennbar hell blaugrün. Größere Ansammlungen sind tief smaragdgrün, alte Kulturen bleichen aus. Keine Eigenbewegungen.

Diese Art ist eine *Chroococcaceae* (Abb. 3).

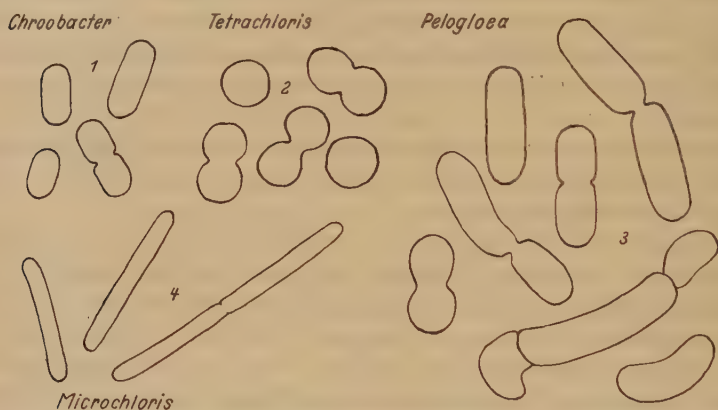


Abb. 1—4. 1 *Chroobacter vantiqhemii*. 2 *Tetrachloris diplococcus*. 3 *Pelagloea chlorina*. 4 *Microchloris nadsonii*. Vergr. 5000 mal.

Microchloris nadsonii nov. gen., nov. spec. (*Chlorobacteriaceae*, *Chlorobacteriales*). Bakterienartige Stäbchen von $0,4\mu$ Dicke und $2,5-4,5$ (-6) μ Länge, einzeln farblos, in kleinen Häufchen gelbgrün, im Dunkelfeld ebenso. Sie sind in halbflüssigen zähen Schleim eingebettet, so daß die Zellen immer in einem Abstand voneinander liegen. Die Schleimmasse lagert in der Tiefe der Kulturen und ist durch eine ziemlich scharfe, waagerechte Fläche von der darüberstehenden Flüssigkeit getrennt. Junge Ansammlungen durchsichtig gelblich, alte olivengrün, auf dunklem Hintergrund dunkelblaugrün. Daraus mit der Pipette entnommene und in Wasser übertragene Tropfen verteilen sich langsam. Vermehrung durch Querteilung. Keine Eigenbewegung. Das kleinste bisher beschriebene grüne Bakterium (Abb. 4).

Zusammenfassung.

Unter den bakterienähnlichen grünen Lebewesen gibt es zwei Gruppen von verschiedener systematischer Stellung. Die einen sind blaugrün, enthalten Chlorophyll a und scheiden am Licht Sauerstoff aus, sind also *Cyanophyceen*. Die anderen sind grünlich gelb, enthalten Bacteriochloro-

phyll wie Purpurbakterien und sind anaerob. Dies sind *Chlorobacteriaceen*. GEITLER und PASCHERS „*Cyanochloridinae*“ gehören wahrscheinlich alle entweder zur einen oder zur anderen Gruppe.

Summary.

There are two, taxonomically different, groups of green bacteroid organisms; those of blue-green colour, containing chlorophyll a and producing free oxygen in the light are small *Cyanophyceae*. The others are greenish yellow, contain the same bacteriochlorophyll as do Purple Bacteria, and are anaerobic. These are *Chlorobacteriaceae*. The „*Cyanochloridinae*“ of GEITLER and PASCHER belong probably all either to the one or to the other group.

Literatur.

BAVENDAMM, W.: Die farblosen und roten Schwefelbakterien des Süß- und Salzwassers. Grundlinien zu einer Monographie. Pflanzenforsch. (Kolkwitz) 2, Jena 1924. — BENECKE, W.: Bau und Leben der Bakterien. Leipzig und Berlin 1912. — BORESCH, K.: Die Färbung von Cyanophyceen und Chlorophyceen in ihrer Abhängigkeit vom Stickstoffgehalt des Substrates. Jb. wiss. Bot. 52, 145 (1913). — BUDER, J.: Chloronium mirabile. Ber. dtsh. bot. Ges. 31, 80 (1913). — Zur Biologie des Bakteriopurpurins und der Purpurbakterien. Jb. wiss. Bot. 58, 525 (1919). CZURDA, V., u. E. MARESCH: Beiträge zur Kenntnis der Athiorhodobakterien-Gesellschaft. Arch. f. Mikrobiol. 8, 99 (1937).

DANGEARD, P. A.: Observations sur le groupe des bactéries vertes. Le Botaniste 4, 1 (1895).

ENGELMANN, TH. W.: Zur Biologie der Schizomyceten. Bot. Ztg. 40, 185 (1882); Die Purpurbakterien und ihre Beziehungen zum Lichte. Bot. Ztg. 46, 677 (1888).

GEITLER, L.: Cyanophyceae in Süßwasserflora, 12. Jena 1925. — GEITLER, L., u. A. PASCHER: Cyanochloridinae-Chlorobacteriaceae in Süßwasserflora 12, 451. Jena 1925. — GICKLHORN, J.: Über den Blauglanz zweier neuer Oscillatorien. Österr. Bot. Z. 70, 1 (1921).

LARSEN, H.: On the Culture and General Physiology of the Green Sulfur Bacteria. J. Bacteriol. 64, 187 (1952). — LAUTERBORN, R.: Zur Kenntnis einiger sapropelischer Schizomyceten. Allg. Bot. Z. 19, 99 (1913); Die Sapropelische Lebewelt, Verh. nat. med. Ver. Heidelberg. N. F. 13, 394 (1915).

MAGNUS, W., u. B. SCHINDLER: Über den Einfluß der Nährsalze auf die Färbung der Oscillarien. Ber. dtsh. bot. Ges. 30, 314 (1912). — METZNER, O.: Über den Farbstoff der grünen Bakterien. Ber. dtsh. bot. Ges. 40, 125 (1922).

NADSON, G.: Zur Morphologie der niederen Algen. Bull. Jard. Imp. Bot. 6, St. Petersburg 1906; Mikrobiologische Studien. I. Chlorobium limicola Nads., ein grüner Organismus mit inaktivem Chlorophyll. ibid. 12, 55. (1912).

NIEL, C. B. VAN: On the morphology and physiology of the Purple and Green Sulfur Bacteria. Arch. Mikrobiol. 3, 1 (1931); The culture, general physiology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. Bacter. Rev. 8, 1 (1944); Chlorobacteriaceae in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 6. Aufl., S. 869 (1948a) (eingeliefert 1944); Taxonomy of Green Bacteria, in Bergey's abridged Manual of Determinative Bacteriology (1948b). — NIKLITSCHKE, A.: Das Problem der Oscillatorienbewegung I. Die Bewegungserscheinungen der Oscillarien. Beih. Bot. Zbl. Abt. A. 52, 205 (1934).

PRINGSHEIM, E. G.: Zur Physiologie der Schizophyceen. Beitr. Biol. Pfl. 12, 49 (1913); Neues über Purpurbakterien. Naturwiss. 20, 479 (1932); Pure Cultures of Algae. Cambridge 1946a; The biphasic or soil-water culture method for growing

algae and flagellata. J. Ecol. **33**, 193 (1946b); The relationship between Bacteria and Myxophyceae. Bacter. Rev. **13**, 47 (1949).

RABINOWITSCH, E. I.: Photosynthesis and related processes. Vol. I. New York: Fischer und Stern 1940 (1945).

SEYBOLD, A., u. K. EGLE: Zur Kenntnis des Bacteriochlorophylls. Sitz.ber. Heidelb. Akad. Wiss., Math.-nat. Kl. Jg. 1939, Abh. 7 (1939). — SMITH, J. H. C.: Factors affecting the transformation of protochlorophyll to chlorophyll. Ann. Rep. Dir. Dept. Plant Biol. Carnegie Inst. Washington, Yearbook **51**, 151 (1952). — STANIER, R. Y., and C. B. VAN NIEL: The main outlines of bacterial classification. J. Bacter. **42**, 437 (1941).

UTERMÖHL, H.: Phaeobakterien. Biol. Zbl. **43**, 605 (1924).

WINOGRADSKY, S.: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Bakterien. I., Schwefelbakterien (1888).

(Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe.)

Weitere Untersuchungen an Myxobakterien.

Von

HANS KÜHLWEIN.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 26. Juni 1953.)

Zur Entwicklungsphysiologie der Fruchtkörper.

Die Bildung von Fruchtkörpern ist bei den Myxobakterien ein interessantes entwicklungsphysiologisches Phänomen. Es hat viel Ähnlichkeit mit den reproduktiven Vorgängen bei den *Acrasieen*, wo sie durch zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre (BONNER 1950) weitgehend aufgeklärt wurden. Während sich das Sporangium der *Acrasieen* aus Amöben aufbaut, die nur im Stiel durch einen Celluloseschleim (RAPER

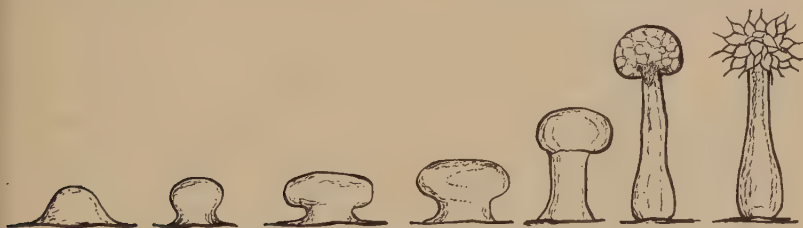


Abb. 1. Fruchtkörperentwicklung von *Chondromyces apiculatus* Thaxter (?).

1951) zusammengehalten werden, kommt bei den Myxobakterien dem Schleim als formativem Element eine sehr viel größere Bedeutung zu. Dabei treten die mehr oder minder deutlich sichtbaren Schleimsockel der *Myxococcaceen* oder die Schleimhüllen der *Polyangien* zurück gegenüber den Schleimstielen, die am typischsten in der Gattung *Chondromyces* anzutreffen sind.

Gestaltenden Einfluß gewinnt der Schleim, sobald sogenannte Sammelzentren entstehen, d. h. Anhäufungen vegetativer Bakterienzellen, aus denen sich die Fruchtkörper differenzieren. Durch gerichtete Schleimabsonderung kommt dann eine Polarität zustande, und der in Cystophor und Cystenköpfchen bzw. Cysten gegliederte Fruchtkörper erzeugt nicht selten wiederum polar orientierte Folgeformen (KÜHLWEIN 1952).

Mit der Schleimstielbildung ist also die Fruchtkörperentwicklung nicht abgeschlossen. Wie aus Abb. 1 hervorgeht, teilt sich die vom Cystophor

getragene Stäbchenmasse in mehr oder minder viele Einzelteile, die die Gestalt charakteristisch geformter Cysten annehmen. Inwieweit dabei der Schleim noch mitwirken dürfte, soll später erörtert werden.

Die Fruchtkörperbildung wird so durch zwei Vorgänge bestimmt, die nicht zwangsläufig miteinander gekoppelt zu sein scheinen. Zunächst ist es die gerichtete Schleimproduktion der Stäbchenmasse, die mit einem dimensionierten Cystophor endigt. Daran schließt sich die Differenzierung des Sporangienköpfchens unter Bildung von Cysten.

Weitere Untersuchungen galten nunmehr der Frage, welche Faktoren Stielbildung und Cystendifferenzierung zu beeinflussen vermögen, bzw. ob und inwieweit beide Vorgänge miteinander in Zusammenhang stehen.

Bezüglich der Schleimstielbildung wurde früher schon ausgeführt (KÜHLWEIN 1952), daß sie direkt von der verfügbaren Bakterienmasse abhängt, die Größe des sogenannten Sammlungszentrums also die Dimension des Cystophors bestimmt. Der Schleimstiel hat demnach das Vorhandensein des Sammlungszentrums zur Voraussetzung und weiter dessen Bereitschaft zur Schleimproduktion. Diese hängt offenbar wieder von einem ganz bestimmten physiologischen „Zustand“ ab, denn mitunter bilden sich auch Sammelzentren, die keine Schleimstiele hervorbringen.

Über das Zusammenströmen vegetativer Zellen zu Sammlungszentren und die daran anschließende Fruktifikation hat man sich schon verschiedentlich Gedanken gemacht. JAHN (1924) glaubt, daß ein die Cystenbildung auslösender Reiz die Front vegetativer Stäbchen erfaßt und die Verteilung derselben reguliert. Ob es sich dabei um ein spezifisches Prinzip handelt ähnlich dem Acrasin der *Dictyostelien*, kann vorerst nicht entschieden werden. Ein zwingender Grund für die Annahme eines solchen spezifischen Reizstoffes scheint indessen nicht vorzuliegen. Beobachtungen an *Polyangium fuscum* sprechen dafür, daß schon Nährstoffgradienten die Fruchtkörperbildung auslösen können. Auf Peptonagar wächst diese Art als dicke, schleimige, gelblich gefärbte Haut, die sich mit einer Pinzette als Ganzes leicht abheben läßt. Auf nährstofffreien Agar übertragen, ist sie bereits nach etwa 12 Std in üppiger Cystenbildung begriffen und wenige Stunden später sind ursprüngliche Form und Farbe völlig verändert und kugelige Cysten vom hellen bis dunklen Braun in Menge vorhanden. Abgesehen von einer Umorientierung der Stäbchen im Schleim, wovon in anderem Zusammenhang noch die Rede sein wird, hat der plötzliche Nährstoffentzug offensichtlich die Cystenbildung ausgelöst. Die dabei erfolgende stoffliche Veränderung des Schleims führt dann zur Differenzierung der Cystenhüllen.

Über die morphogenetischen Bewegungen bei *Myxococcaceen* hat auch STANIER (1942) berichtet. Er konnte nachweisen, daß Spannungen im Agar die Anlage und Anordnung der Fruchtkörper bestimmen, und er spricht in diesem Zusammenhang von einer Elastikotaxis. Dieses

Phänomen läßt sich bei den *Myxococcaceen* besonders gut beobachten. Sicher ist aber die Elastikotaxis nicht die einzige Erscheinung, die bei der Formbildung der Myxobakterien eine Rolle spielt, vielmehr haben die formbildenden Bewegungen auch noch andere Aspekte. Der Schwarm von *Chondromyces* z. B. breitet sich auf einer Futterbakterienschicht auf Filtrierpapier von einem Punkt nach allen Seiten hin aus, wobei ein peripherer Stäbchenwall sich bildet, der zunehmend stärker wird. Auf *Bacterium coli* war so nach 6 Tagen ein orange gefärbter ringförmiger Wulst entstanden, der sich mehr und mehr profilierte, zerklüftete und zur Differenzierung von Fruchtkörpern schritt (Abb. 2).

Hier liegt also ein dem isodiametrischen Zusammenströmen von Zellen geradezu entgegengesetztes Bewegungsphänomen vor. Es läßt sich nur so erklären, daß die einmal gebildete allseitig vorstoßende Schwarmfront



Abb. 2. Teil einer Schwarmfront von *Chondromyces apiculatus* Thaxter (?) und beginnende Differenzierung der Fruchtkörper. Schematisch.

die Futterbakterien aufzehrt und unter fortwährender Vermehrung der Stäbchen peripher mehr und mehr erstarkt. Innerhalb der Front ist einer weiteren Vermehrung der Bakterien die Ernährungsgrundlage entzogen, weil hier die Futterbakterienschicht bereits aufgebraucht ist. Die Schwarmfront bleibt also immer an der Nahrungsquelle. Von hier aus ergeben sich auch gewisse Anhaltspunkte für die Deutung sogenannter Hexenringe. JAHN (1924) hat die Ursache solcher Fruchtkörperanordnungen in einer Nährstofferschöpfung des konzentrisch sich ausbreitenden Stäbchenschwarms gesehen. Davon kann hier nicht die Rede sein, zumal nicht selten einem ersten Ring von Fruchtkörpern eine zweite Schwarmfront folgt, die je nach der Menge der noch vorhandenen Futterbakterien wieder zur Fruktifikation schreiten kann. Damit dürfte auch die Annahme einer erblich bedingten Ursache der Hexenringbildung hinfällig sein, wie wir sie früher bei *Myxococcaceen* deuteten (FINCK 1950), und die auch LIESKE (1926) vermutete.

Die Frage nach der Ursache der entscheidenden formbildenden Vorgänge bleibt zunächst immer noch offen. Vom Schleimstiel wurde eingangs gesagt, daß seine Dimension von der Größe des Sammlungs-zentrums abhängt. Wir müssen nun weiter fragen, wieso es überhaupt zu der plötzlichen starken Schleimabsonderung kommt und ob sie eine experimentell veränderliche Größe ist.

Kulturversuche mit *Chondromyces apiculatus* hatten bisher ergeben (KÜHLWEIN 1952), daß auf Hasenmist normale, kräftige und glatte wandige Cystophore gebildet werden und auch bei der Durchwachsung weiter normale, nur etwas kleinere Fruchtkörper entstehen. Sehr deutliche Einflüsse auf die Gestalt der Cystophore machen sich aber bemerkbar, wenn die Kultur auf Futterbakterien erfolgt¹. Bei Fütterung mit *Bacterium coli* waren die Cystophore ganz hell durchscheinend und stark gekrümmt (Abb. 3). Ein ähnliches Verhalten zeigten sie bei Kultur mit *Staphylococcus citreus*. Über mehrere Passagen auf diesen Bakterien veränderten sie sich noch weiter und hatten etwa das Aussehen von feinrissigem Glas. Der Schleimbildungsprozeß war un-

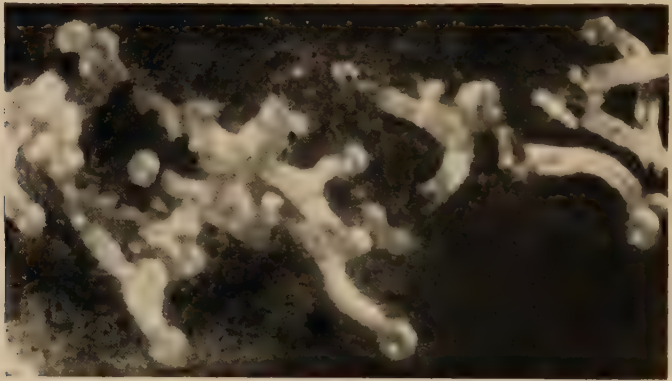


Abb. 3. Fruchtkörperhabitus von *Chondromyces apiculatus* Thaxter (?) auf *Bacterium coli*. Vergr. ≈ 50 fach.

verkennbar gestört, was soweit führte, daß Stiele überhaupt nicht mehr ausgebildet wurden, und die Bakterienmasse sich nur noch mit mehreren Schleimsträngen etwas vom Substrat abhob. Da die Kulturbedingungen in Bezug auf Temperatur und Feuchtigkeit sich nicht änderten, konnte die gehemmte Schleimstielbildung nur durch eine nachhaltige Stoffwechselstörung verursacht worden sein, zumal sich dieses Verhalten auch dann nicht ändern ließ, wenn Rückübertragungen auf Kaninchenmist vorgenommen wurden. Auch nach zahlreichen weiteren Passagen auf dem natürlichen Substrat kam es zu keiner normalen Stielbildung mehr, und neben verrunzelten Cystophoren wurden oft nur noch gekrüscartige Schleimmassen gebildet.

Schleimabsonderung und Gestaltung des Cystophors scheinen also unter Umständen recht veränderliche Größen in der Entwicklung von *Chondromyces* zu sein. Entsprechendes gilt für die Morphogenese der

¹ Über die lytische Fähigkeit von *Chondromyces apiculatus* wird in einer weiteren Veröffentlichung berichtet.

Cysten. Normalerweise gehen sie in mehr oder minder großer Zahl aus dem Cystenköpfchen hervor, wenn dieses einen bestimmten Reifezustand erreicht hat. Nach der zweiten Passage auf Futterbakterien war aber die Differenzierung der Cysten schon völlig unterdrückt (s. auch Abb. 3) und trat auch nach wiederholten Passagen auf Mist nicht wieder ein. Die Cystenköpfchen hatten häufig eine etwas abgeplattete Form, z. T. glichen sie den Köpfchen der Ascomycetenfruchtkörper von *Leotia gelatinosa*. Vielleicht ist diese gestörte Cystogenese die Folge qualitativer Veränderungen des Schleims, so daß die Konsistenz desselben eine normale Entfaltung verhindert. Nachdem sich erwiesen hatte, daß in den Cystenköpfchen eine Carotinoidanhäufung erfolgt (typische Blaufärbung mit kochender H_2SO_4) wurde auch in Erwägung gezogen, ob nicht eine gestörte Carotinoidsynthese Ursache der Entfaltungshemmung der Cystenköpfchen sein könnte. Sichere Anhaltspunkte in dieser Richtung ergaben sich bis jetzt nicht. Versuche mit Diphenylamin als Hemmsubstanz der Carotinoidsynthese (TURIAN u. HAXO 1952) brachten jedenfalls keine Hinweise auf Zusammenhänge zwischen Farbstoffbildung und Cystogenese.

Über die Bewegung der Myxobakterienzellen.

Im vegetativen Zustand kriechen die Myxobakterien als Schwärme über das Substrat hin. Während der fruktifikativen Phase führen morphogenetische Bewegungen über Sammlungscentren zu geformten Fruchtkörpern. Problematisch ist nach wie vor, wie diese Bewegungen zustandekommen. Man hat sich darüber immer wieder Gedanken gemacht (JAHN 1924, STANIER 1942), und erst kürzlich ist K. MEYER-PIETSCHMANN (1952) auf Grund von Lebendbeobachtungen an *Myxococcus rubescens* zu der Überzeugung gekommen, daß die Kontraktilität der Zellen, wie sie beim Kriechen auf Flächen zum Ausdruck kommt, die Ursache der Fortbewegung sein könnte. Die von ihr als Rinnen gedeuteten Kriechspuren der vegetativen Zellen auf Agar sprechen nicht für eine Fortbewegung durch Schleimabsonderung. JAHN (1924) vertrat dagegen die Ansicht, daß durch quantitative Unterschiede in der Ausscheidung von Schleim eine Fortbewegung zustande kommt. JAHN berichtet auch von einer zusammenhängenden Haut, die er durch Fixieren eines Schwarms erhielt. Damit dürfte der Beweis erbracht sein, daß die Masse der Bakterien des Schwarms in Schleim eingebettet ist. Tatsache ist auch, daß die Myxobakterien während ihres gesamten Entwicklungszyklus erhebliche Mengen von Schleim absondern, und es liegt doch sehr nahe, diesen mit dem Bewegungsmechanismus der Zellen in Verbindung zu bringen. Es scheint sogar ein kausaler Zusammenhang zu bestehen zwischen Ernährung, Schleimabsonderung und Bewegung. So breitet sich *Polyangium fuscum* auf Mistagar als zarter Schwarm aus, der in verhältnismäßig kurzer Zeit schon einen Durchmesser von 1 cm erreicht.

Auf Peptonagar bildet die Species eine dicke zähe Haut, die sich nur langsam ausdehnt. Der Schleim derselben ist von einer Konsistenz, die es unmöglich macht, sie zu zerteilen. Nimmt man sie ab, dann lassen sich auf dem darunterliegenden Agar Zeichen irgendwelcher Veränderung kaum erkennen. Unmittelbar vor der Schwarmfront treten aber deutliche Risse in der Agaroberfläche auf (Abb. 4), die nur so gedeutet werden können, daß der reichlich gebildete Schleim den Agar örtlich entwässert. In der sehr schleimigen Schwarmhaut liegen die Stäbchen sehr dicht zusammen. Beim Übergang zur Cystenbildung muß also eine Umorientierung im Schleim erfolgen, denn die Richtung der Stäbchen in der Cysten ist eine andere als im vegetativen Schwarm. Auch läßt sich un-

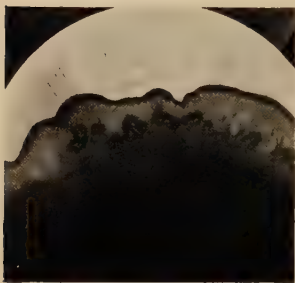


Abb. 4. Schwarmhaut von *Polysporium fuscum* auf Peptonagar. Vor der Schwarmfront „Trockenrisse“ im Agar.

schwer beobachten, wie während der Cystenbildung mehrere Sammelpunkte entstehen und Stäbchen auf dem Wege dorthin im zäher werdenden Schleim der späteren Cysten hüllen stecken bleiben.

Noch andere Beobachtungen sprechen eindeutig für eine Bewegung mit Hilfe von Schleim. Wenn man Quarzglasfasern in den Schwarmbereich von *Chondromyces* senkrecht einsticht, erfolgt häufig ein Emporwandern von Bakterienmassen an denselben, ein Vorgang, der ohne Zweifel nur über eine Schleimsekretion denkbar ist. Das Durchwachsen bei *Chondromyces* hat zur Voraussetzung, daß

Stäbchen aus den Cysten auswandern, wobei sie sich ihr „Gleitmittel“ Schleim erst selbst schaffen müssen.

Soweit Bewegungen direkt auf einer Agaroberfläche stattfinden, was vielleicht bei den dem Schwarm vorauswandernden Einzelzellen der Fall ist, muß berücksichtigt werden, daß der Agar unter normalen Kulturbedingungen immer mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm bedeckt ist. Die Fortbewegung wird also gar nicht unmittelbar auf Agar erfolgen, der abgesonderte Schleim daher immer die Möglichkeit haben, zu quellen und so einen Bewegungsimpuls auslösen können. Es gilt deshalb meines Erachtens weniger die Frage, ob die Bewegung mit oder ohne Schleim zustande kommt, als vielmehr die, ob damit noch eine Kontraktilität der Zellen verbunden ist. Im Falle der morphogenetischen Bewegungen von *Chondromyces*, wo es zu einer gerichteten Sekretion des Schleims kommt, besteht kein zwingender Grund, noch eine Kontraktilität der Bakterien zu postulieren.

Zusammenfassung.

Es wird über die Entwicklungsphysiologie von Myxobakterienfruchtkörpern berichtet. Für die Entstehung und Differenzierung derselben

sind Substrateinflüsse weitgehend bestimmend. Durch einseitige Ernährung mit Futterbakterien wurde bei *Chondromyces apiculatus* eine starke, bleibende Formveränderung erzielt. Zur Frage der Fortbewegung der Myxobakterienzellen werden Befunde mitgeteilt, die eindeutig für eine Beteiligung des abgeschiedenen Schleims am Zustandekommen der Bewegung sprechen.

Literatur.

BONNER, I. T.: Biol. Bull. **99**, 143 (1950). — FINCK, G.: Arch. Mikrobiol. **15**, 358 (1950). — JAHN, E.: Die Polyangiden. Beitr. zur Botan. Protistologie. Leipzig: Bornträger 1924. — KÜHLWEIN, H.: Arch. Mikrobiol. **17**, 403 (1952). — LIESKE, R.: Kurzes Lehrbuch der allgemeinen Bakterienkunde. Berlin: Bornträger 1926. — MEYER-PIETSCHMANN, K.: Arch. Mikrobiol. **16**, 163 (1951). — RAPER, K. B.: Bull. Torrey Bot. Club **79**, 25 (1952). — STANIER, R. Y.: J. Bakter. **44**, 405 (1942) (b.). — SUSSMANN, M., and E. NOEL: Biol. Bull. **103**, 259 (1952). — TURIAN, G., and F. HAXO: J. Bakter. **63**, 690 (1952).

(Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung Quedlinburg der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin.)

Über den Entwicklungsgang von *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox.) Stone.

II. Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Ausbildung der Fortpflanzungsorgane*.

Von

GEORG SÖRGEL.

Mit 19 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. Juli 1953.)

In einer vorangegangenen Untersuchung (SÖRGEL 1953) war festgestellt worden, daß die Ausbildung der Fortpflanzungsorgane bei *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox.) Stone auf einem „Normalnährboden“, einem 1%igen Samenschalendekokt der anfälligen Markerbsensorte „Wunder von Kelvedon“, in drei Phasen verläuft. In der ersten Phase bilden sich fast ausschließlich Pyknidien, in der zweiten vor allem Pseudothecien, und in der dritten beginnt die Vermehrung der Chlamydosporen. Dabei entstand die entscheidende Frage, wie eine derartige Aufeinanderfolge zustande kommt, ob es sich um einen endogenen Rhythmus oder um eine bestimmte Wirkung von Außenbedingungen handelt.

Unter Anwendung derselben Technik wurde wiederum mit der Filtrierpapiermethode gearbeitet (SÖRGEL 1951).

Zur Klärung der Frage wurde zunächst ein 1%iger Erbsen-Samenschalendekokt verwendet, der aber bereits von *Mycosphaerella* bewachsen war. Die Dauer der Bewachsung war in den einzelnen Versuchen verschieden lang. Wurde das Substrat dann neu beimpft, und traten die nach dem Substrat- und somit Mycelalter erwarteten Organe als erste oder wenigstens bevorzugt auf, so war mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß die Nährbodenbedingungen für das Auftreten einer bestimmten Organart besonders günstig, für das einer anderen ungünstig geworden waren.

Nachdem der Pilz sich eine bestimmte Zeit auf dem Nährmedium entwickelt hatte, wurde die Nährlösung mit Hilfe steriler Pipetten von jeweils zwei gleichzeitig beimpften Kulturen gemischt und eine neue Schale damit gefüllt. (Zwei Kulturen mußten genommen werden, da die im Papier festgehaltene Flüssigkeit an der für eine neue Schale notwendigen Menge von 40 ml fehlte.) Dann wurde das frisch darüber gelegte Papierblatt neu beimpft.

Für unsere Fragestellung wichtig sind folgende Ergebnisse. 1. Je länger der Nährboden vorher bewachsen war, umso weniger Organe wurden gebildet. 2. Die Bildung begann bevorzugt mit den Organen der

* Quedlinburger Beiträge zur Züchtungsforschung Nr. 15.

zu der betreffenden Zeit fälligen Phase. So fehlten z. B. auf einem Nährboden, der nach 216 Std neu beimpft worden war, die Pyknidien vollständig; als erste Organe traten Pseudothecien auf, gefolgt von Chlamydosporen. Auf einem Nährboden, der vorher 360 Std bewachsen war, entstanden nur Chlamydosporen. 3. In allen Kulturen war der Beginn der Organbildung verzögert und zwar umso mehr, je älter das Substrat geworden war.

Diese Ergebnisse schienen zunächst dafür zu sprechen, daß der Nährboden vielleicht bis zu einem gewissen Grade „verbraucht“ sein mußte. Die Zonenbildung wäre dann mit einem unterschiedlichen Nährstoffbedürfnis der einzelnen Organe zu erklären. Da aber die Nährlösung, je länger sie als Substrat für den Pilz gedient hatte, alkalischer geworden war, mußte festgestellt werden, ob unter sonst gleichen Bedingungen auch eine verschiedene Reaktion des Nährbodens die Organbildung wesentlich beeinflußt.

Als erstes wurde in einer großen Zahl gleichzeitig angesetzter Kulturen mit einem p_H -Messer¹ täglich bei drei Kulturen die Konzentration der Wasserstoffionen im Nährmedium (cH) gemessen und bei einer dieser Kulturen außerdem die Anzahl sämtlicher Organe festgestellt (Abb. 1). Das anfängliche p_H der Nährlösung von 5,04 änderte sich in den ersten Tagen nur unerheblich. Nach einem geringen Anstieg ist bei 96 Std — gerade mit dem Optimum der Pyknidienbildung zusammenfallend — wieder der Ausgangswert erreicht. (Eine Wiederholung desselben Versuchs hatte das gleiche Ergebnis!) Danach wurde die Nährlösung von Tag zu Tag weniger sauer. Nach 432 Std Kulturdauer wurde schließlich ein Wert von p_H 6,90 erreicht. Wichtig ist vor allem die Reaktion der Nährlösung während der einzelnen Entwicklungsphasen. Die geringe Änderung in der Pyknidienphase wurde bereits erwähnt. Während des Optimums der Pseudothecienphase (216—264 Std) — es wurden in diesem Falle sämtliche Pseudothecien, die inneren und die äußeren (SÖRGE 1953), zusammengezählt — bewegte sich das p_H zwischen 6,4 und 6,61. In der Chlamydosporenphase schließlich war das p_H auf 6,8 gestiegen.

Es scheint also die Reaktion des Nährbodens irgendwie mit in den Ablauf der drei Hauptphasen einzugreifen. Der sichere Nachweis einer solchen Beziehung konnte mit Hilfe der Filtrierpapiermethode durchgeführt werden. Wie an anderer Stelle bereits erörtert wurde (SÖRGE 1952), reagiert ein Mycel, welches auf einem Nährboden ganz geringer Konzentration vorkultiviert wird, beim Übertragen auf das eigentliche Versuchssubstrat geradezu schlagartig auf die neuen Bedingungen. Die geringe Anzahl von Organen (meist Chlamydosporen, wenig Pseudothecien, ganz selten Pyknidien), die auf einem nährstoffarmen Medium noch

¹ Typ 158, R-F-T, Funkwerk Erfurt, mit einer niederohmigen Glaselektrode von Schott.

entsteht, störte nach einmaliger Feststellung ihrer Menge ein späteres Zählen neuentstehender Organe nicht. Die alten Organe sind nämlich durch ihre dunkle Farbe und ihre fertige Gestalt leicht zu erkennen.

Es wurden die 4 pH-Stufen 5,0, 6,0, 7,0 und 8,0 untersucht. Zur Herstellung der verschiedenen Stufen wurden zunächst Lösungen von $\frac{1}{15}$ mol Na_2HPO_4 und $\frac{1}{15}$ mol KH_2PO_4 bereitet. Die zur Erreichung jeder einzelnen pH-Stufe notwendigen Mengen beider Lösungen wurden getrennt in einem Kölbchen sterilisiert und dann erst zusammengegossen. Parallel dazu wurde ein 2%iger Samenschalendekokt gekocht. Schließlich wurden 20 ml des Dekoktes mit 20 ml der pH-Stufenlösung zu-

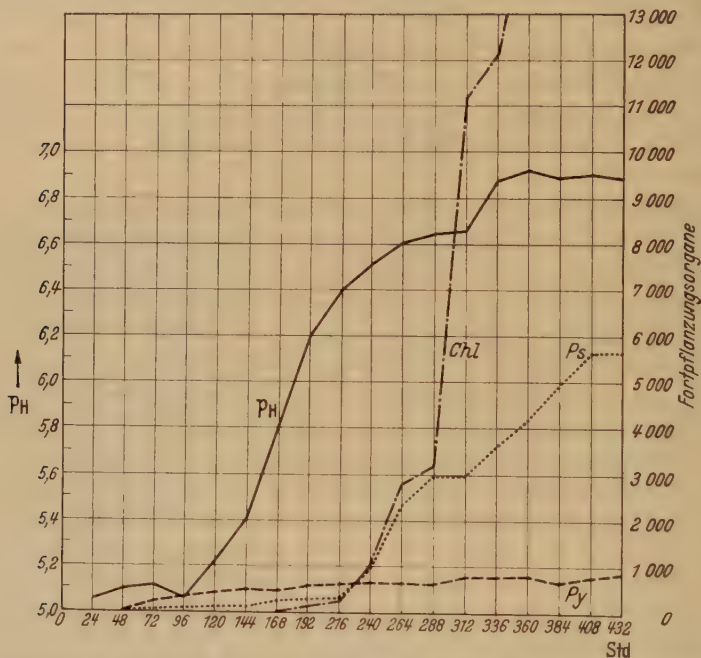


Abb. 1. pH-Änderung (pH) und Bildung der Fortpflanzungsorgane (Pyknidien P^{II} , Pseudothecien Ps und Chlamydozoosporen Chl).

sammengegossen und so die notwendigen 40 ml für unsere Kulturgefäße eines 1%igen Samenschalendekoktes von einer bestimmten pH-Stufe erhalten. Für die Untersuchungen wurde der Pilz auf einem normalen 0,1%igen Samenschalendekokt vorkultiviert. Nach einer Entwicklungszeit von genau 10 Tagen wurde das Filtrierpapierblatt vorsichtig so abgehoben, daß sich das zarte Submersmycel vom Filtrierpapier löste, und das Filtrierpapier selbst wurde dann auf die Lösungen der verschiedenen pH-Stufen übertragen.

Die Kulturen, die wegen der außerordentlich schnellen Organbildung alle 6 Std kontrolliert werden mußten, zeigten schon nach 36 Std ein ganz verschiedenes Bild. Die meisten Organe (615) hatten sich bei pH 5,0 entwickelt; bei pH 6,0 waren es 391, bei pH 7,0 sogar nur 5 und bei pH 8,0 waren überhaupt noch keine Organe vorhanden. Eine eindeutige Aus-

sage, ob es sich dabei um Pyknidien oder Pseudothecien handelte, konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht gemacht werden. Während außerdem bei p_H 5,0 und 6,0 bereits 16 Ringe besiedelt waren, waren es bei p_H 7,0 nur 4. Bei der nächsten Zählung (42 Std) hatten die ersten beiden Kulturen fast die gleiche Menge an Organen (1442 bzw. 1454) erreicht; bei p_H 7,0 waren es nur 196. Erst nach 78 Std waren bei p_H 8,0 die ersten 21 Organe ausgebildet. Demnach wird also der Beginn der Organbildung um so mehr verzögert, je geringer die Konzentration der Wasserstoffionen im Medium ist.

Das Luftmycel wird von p_H 5,0 (fast gar nicht vorhanden) bis p_H 8,0 (makroskopisch zu erkennen) immer stärker ausgebildet. Eine gewisse Möglichkeit, die verschieden starke Ausprägung dieses Luftmycels zu erfassen, ergab die Zählung der sich in diesen Hyphen bildenden Chlamydosporen (Tab. 1); ihre Zahl steigt bis p_H 7,0 und erreicht, abgesehen

Tabelle 1. Anzahl der sich bei verschiedenem p_H in den Lufthyphen bildenden Chlamydosporen.

Stunden	p_H 5,0	p_H 6,0	p_H 7,0	p_H 8,0
132	0	0	489	0
144	0	13	1190	0
168	0	73	1910	725
190	—	—	—	1650

vom späteren Beginn, auch bei p_H 8,0 sehr schnell einen hohen Wert. Allerdings erfährt, wie später noch gezeigt werden wird, die Brauchbarkeit einer Beziehung zwischen Luftmycel und Chlamydosporenbildung als Maß für die Menge der Lufthyphen eine gewisse Einschränkung. Trotzdem bleibt die Tatsache bestehen, daß um so mehr Luftmycel ausgebildet wird, je alkalischer das Medium ist.

Die Entwicklung aller drei Organe ergibt sich aus Tab. 2. Pyknidien waren mit der schon erwähnten Ausnahme von p_H 8,0 bereits nach 36 Std ausgebildet. Die meisten wies die Kultur von 5,0, die wenigsten die von p_H 7,0 auf. Eine geringe Überlegenheit von p_H 5,0 gegenüber 6,0 blieb dauernd bestehen. Als die Beobachtung der Kulturen abgebrochen wurde, enthielten diese beiden Kulturen 2659 bzw. 2450 Pyknidien. Bei p_H 7,0 war rund ein Drittel dieser Menge gebildet worden und bei p_H 8,0 waren sogar weniger als $\frac{1}{10}$ entstanden (Tab. 2). Daraus geht eindeutig hervor, daß die Anzahl der Pyknidien bei Abnahme der Acidität geringer wird.

Ein ganz anderes Bild zeigt die Pseudothecienentwicklung. Mit Ausnahme von p_H 8,0 waren in allen Kulturen nach 42 Std Pseudothecien vorhanden. 50 waren bei p_H 7,0 gebildet worden, 151 bei p_H 6,0 und 104 bei p_H 5,0. Nach 54 Std jedoch hatte die Kultur von p_H 7,0 die von

Tabelle 2. Zahl der zu den einzelnen Beobachtungszeiten bei verschiedenen pH-Stufen aufgetretenen Fortpflanzungsorgane.

Beobach- tungszeit Std	Pyknidien				Pseudothecien				Chlamydosporen			
	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0
36	615	391	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	1323	1303	146	0	104	151	50	0	0	0	0	0
48	1681	1598	223	0	485	589	154	0	0	0	0	0
54	1840	1678	347	0	758	1173	738	0	0	0	0	0
60	1975	1716	424	0	1020	1457	1573	0	0	0	0	0
72	2438	2265	483	0	1704	2869	4787	0	0	0	78	—
78	—	—	—	14	—	—	—	7	—	—	—	—
84	2606	2320	518	31	1860	4451	6970	21	0	0	605	—
90	—	—	—	68	—	—	—	61	—	—	—	—
96	2612	2351	585	90	2286	5705	10267	110	0	11	1040	—
102	—	—	—	115	—	—	—	207	—	—	—	—
108	—	—	—	182	—	—	—	642	—	—	—	—
114	—	—	—	213	—	—	—	1595	—	—	—	—
120	2649	2371	924	213	2362	6145	12639	2135	1	118	2908	—
132	—	—	—	213	—	—	—	3841	—	—	—	—
144	2656	2394	979	213	2380	6368	13593	5153	194	1170	7228	—
156	—	—	—	213	—	—	—	6705	—	—	—	32
168	2659	2470	987	213	2380	6394	13920	7642	896	3570	13032	88
190	—	—	—	213	—	—	—	8045	—	—	—	157

pH 5,0 fast eingeholt, und nach 60 Std waren es bei pH 7,0 bereits 7.99% mehr als bei pH 6,0. Nach weiteren 12 Std (72 Std nach dem Verpflanzen, hatten sich bei pH 7,0 schon 4787, bei pH 6,0 erst 2869 und bei pH 5,0 nur 1704 Pseudothecien entwickelt. Bei pH 8,0 setzte die Bildung nach 78 Std ein und hatte schon nach 126 Std die Kultur von pH 5,0 übertrroffen. Die Pseudothecienbildung steigt also von pH 5,0 über pH 6,0 bis zu einem Optimum bei pH 7,0 und fällt dann nach pH 8,0 zu wieder ab. Sie ist aber gegenüber der Pyknidienbildung in allen Kulturen etwas verzögert.

In den Kulturen waren außer den einzelstehenden Pseudothecien auch einige Stromata mit mehreren Organen zu finden. Sowohl die Menge der Stromata als auch der Besatz jedes Stromas mit Pseudothecien steigt von pH 5,0 auf pH 6,0 an, doch waren bei pH 7,0 überraschend wenig, bei pH 8,0 überhaupt keine mehr zu finden (Tab. 3).

Die Chlamydosporen traten in allen Kulturen noch später als die Pseudothecien auf, bei pH 8,0 sogar erst 144 Std nach dem Verpflanzen.

Tabelle 3. Vergleich der bei verschiedenen pH-Stufen auftretenden Stromata.

Stroma mit	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0
2 Pseudothecien . . .	14	50	6	0
3 Pseudothecien . . .	1	4	1	0
4 Pseudothecien . . .	1	3	0	0

Am relativ schnellsten, „schon“ nach 72 Std erschienen die ersten Chlamydosporen bei p_H 7,0. Bei p_H 6,0 wurden die ersten Chlamydosporen 24 Std später gefunden. Wieder einen Tag später war auch bei p_H 5,0 eine Chlamydospore aufgetreten. Am schnellsten nahm ihre Zahl bei p_H 7,0 zu. Ganz langsam dagegen vermehrten sie sich bei p_H 5,0. Außerordentlich rasch ging ihre Bildung bei p_H 8,0 vonstatten, nachdem sie einmal in Gang gekommen war. Sie überflügelte bald alle anderen Kulturen, so daß diese Kultur am Ende der Entwicklung an der Spitze

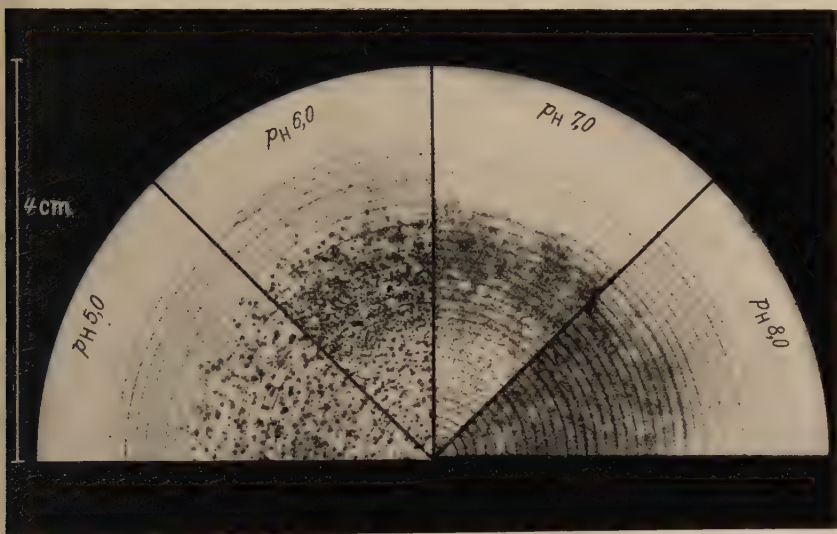


Abb. 2. Pilzentwicklung auf verschiedenem p_H nach 190 Std Kulturdauer.

stand (Tab. 2). Die Anzahl der Chlamydosporen wird demnach mit Zunahme der Alkalität größer; sie verhalten sich also entgegengesetzt wie die Pyknidien.

Die Bildung der Fortpflanzungsorgane zeigt demnach eine deutliche Abhängigkeit von der cH . Die Reihenfolge in der Organentstehung bleibt auch bei den verschiedenen p_H -Stufen genau so wie auf einem „Normalnährboden“ erhalten. Diese Tatsache läßt sich auch makroskopisch in den einzelnen Kulturen erkennen (Abb. 2). Um die Wirkung der einzelnen p_H -Stufen weiter aufklären zu können, muß die Organentstehung vergleichend in Abhängigkeit vom p_H betrachtet werden. Der Vergleich wurde für Pyknidien und Pseudothecien durchgeführt. Beide Organe sind relativ ähnlich gebaut. Da bei den verschiedenen Stufen trotz prinzipiell gleicher Aufeinanderfolge der jeweilige Beginn der Organentstehung, die Bildungsrate und die absolute Menge verschieden waren, wurde zur besseren Veranschaulichung eine besondere Darstellungsweise (Abb. 3)

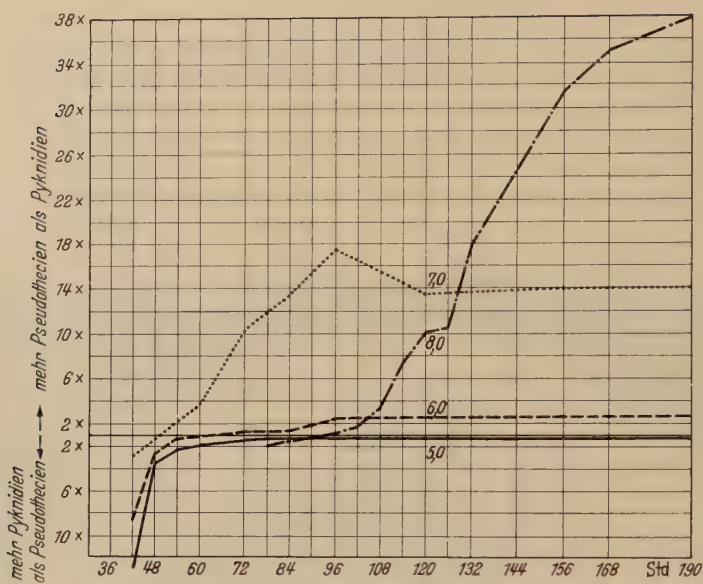


Abb. 3. Verhältnis von Pyknidien zu Pseudothecien bei pH 5,0–8,0.

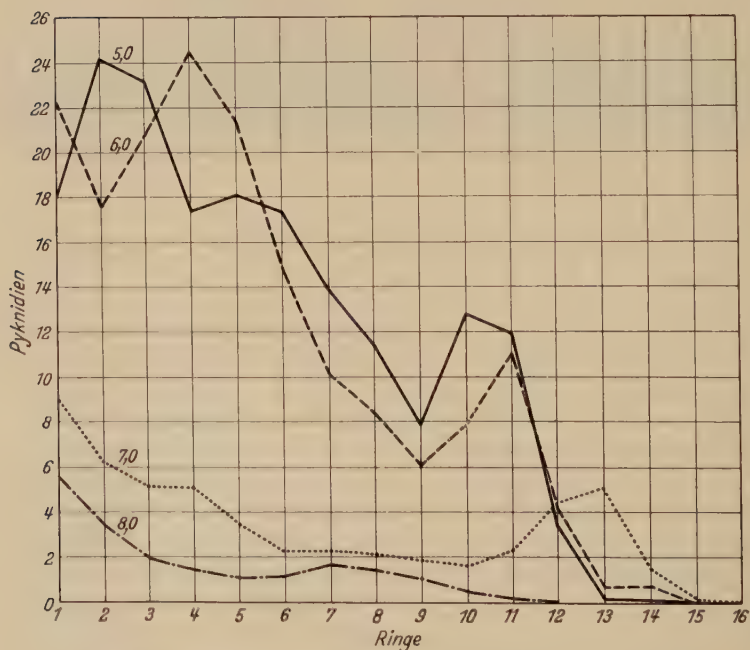


Abb. 4. Dichte der Pyknidien auf der Kulturoberfläche bei pH 5,0–8,0.

gewählt. Es wurde in sämtlichen Kulturen für sämtliche Zeiten das Verhältnis von Pyknidien zu Pseudothecien bestimmt. Der Augenblick, in dem Pyknidien und Pseudothecien in gleicher Anzahl vorhanden sind, wird durch eine Gerade gekennzeichnet, die parallel zur Abszisse verläuft. Die Werte unterhalb dieser Geraden geben an, wieviel mal mehr Pyknidien als Pseudothecien, die Werte oberhalb, wieviel mal mehr Pseudothecien als Pyknidien in den Kulturen vorhanden sind. In allen Kulturen haben zunächst die Pyknidien das Übergewicht. Mit Ausnahme von $pH\ 5,0$, wo bis zum Schluß mehr Pyknidien vorhanden sind, nimmt die Zahl der Pseudothecien umso schneller zu, je alkalischer das Medium ist.

Aufschlußreich ist auch ein Vergleich der Anordnung der verschiedenen Organe in den einzelnen Kulturen. Als Maß für die Dichte ist jeweils die Menge der Organe berechnet, die in den einzelnen 2 mm-Ringen auf einer Fläche von 10 mm² vorhanden sind. Die Pyknidien (Abb. 4) liegen bei allen Kulturen in der Mitte am dichtesten. Außerdem ist ein zweites, weniger hohes Optimum ausgebildet, welches bei Zunahme der Alkalität immer weiter nach außen rückt. Dieser erneute Anstieg der Pyknidiendichte läßt sich jedoch leicht mit einem neuen Hyphenwachstum des Pilzes nach dem Übertragen aus der Vorkultur erklären. Auf das anscheinend andere Verhalten von $pH\ 8,0$ kommen wir noch zurück. Dabei ist nun interessant, daß auch hier die zu-

erst gebildeten Organe wiederum Pyknidien, und zwar in der gleichen mengenmäßigen Abstufung wie in den inneren Ringen sind. Wir kommen also zur Feststellung, daß bei Abnahme der Acidität die Pyknidiendichte geringer wird, und daß übereinstimmend bei allen Kulturen die Pyknidien in der Mitte am dichtesten gelagert sind.

Die Verteilung der Pseudothecien (Abb. 5) stimmt nur bei $pH\ 7,0$ und $8,0$ mit der der Pyknidien überein. Sie sind allerdings 5–6 mal so dicht gelagert. Bei $pH\ 5,0$ und $6,0$ drängen sich die Pseudothecien, wenn man

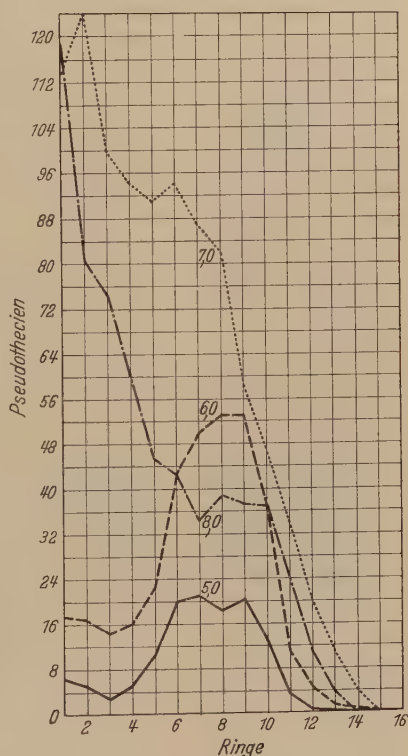


Abb. 5. Dichte der Pseudothecien auf der Kulturoberfläche bei $pH\ 5,0-8,0$.

von einer noch zu erklärenden höheren Dichte im ersten und zweiten Ring absieht, im sechsten bis neunten Ring zusammen. Das bedeutet aber, daß die zonenförmige Anordnung der Fortpflanzungsorgane nur bei den p_H -Stufen 5,0 und 6,0 dem eines Normalnährbodens ähnlich ist und bei p_H 7,0 und 8,0 diese Anordnung zumindest undeutlich geworden ist.

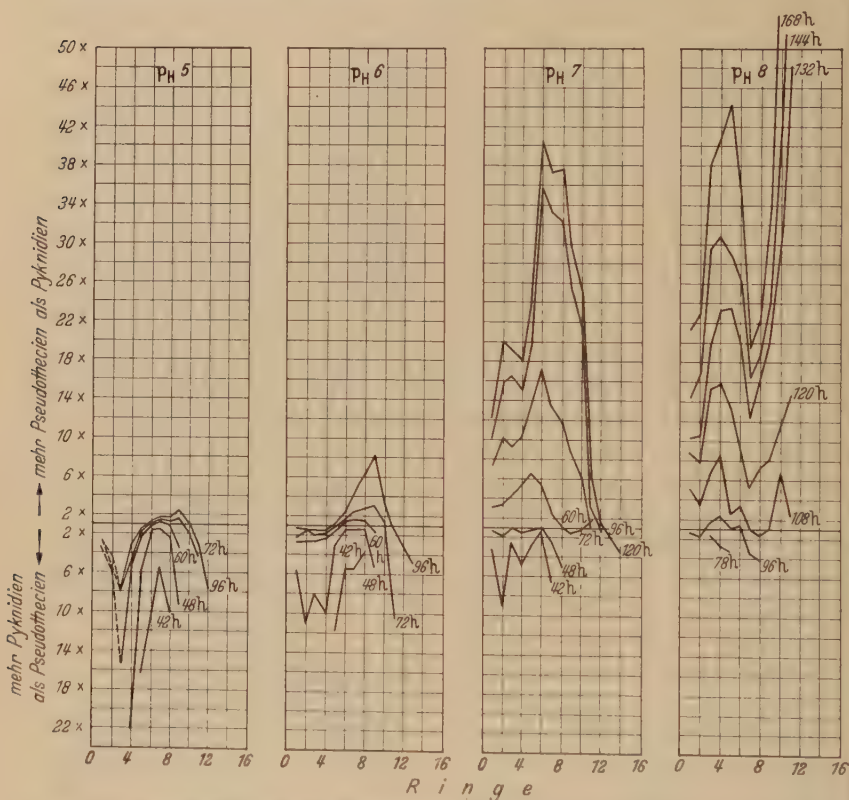


Abb. 6. Verhältnis von Pyknidien zu Pseudothecien auf der Kulturoberfläche bei vier p_H -Stufen zu verschiedenen Beobachtungszeiten.

Noch klarer wird das Verhältnis von Pyknidien zu Pseudothecien wenn wir (wie in Abb. 3) die Verteilung dieser beiden Organe auf die einzelnen Ringe zu den verschiedenen Beobachtungszeiten auftragen. Das Verhältnis beider Organe verschiebt sich von p_H 5,0 bis 8,0 zugunsten der Pseudothecien (Abb. 6).

Nach 42 Std sind bei p_H 5,0 im 7. Ring 6mal soviel Pyknidien wie Pseudothecien vorhanden (in den beiden benachbarten Ringen sind es rund 10mal soviel). Die Überlegenheit an Pseudothecien geht allmählich auf den 9. Ring über, und zum Schluß sind in fünf benachbarten Ringen etwas mehr Pseudothecien als Pyknidien

vorhanden (im 9. Ring 2,46mal soviel). Innen sind bis zum 3. Ring zwar auch verhältnismäßig viel Pseudothecien zu finden, doch bleiben diese in einem frühen Entwicklungsstadium stecken (in der Abbildung durch gestrichelte Linien angedeutet). Damit findet auch die frühere Feststellung (SÖRGEL 1953) ihre Erklärung, daß die in der Mitte einer nicht gepufferten Nährlösung sich bildenden Pseudothecien zu einer Zeit also, wo diese Nährlösung noch sauer reagiert, selten reif werden bzw. sich nicht vollkommen ausbilden.

Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei der nächsten pH-Stufe. Auch hier verschiebt sich das Optimum vom 7. auf den 9. Ring. Die Zone, in der mehr Pseudothecien gebildet werden, reicht vom 5. bis zum 11. Ring. Im Endzustand befinden

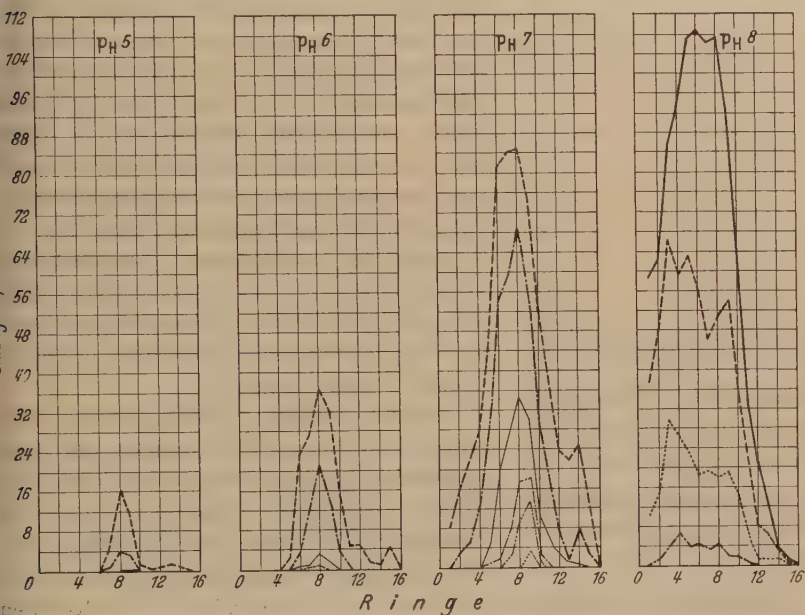


Abb. 7. Dichte der Chlamydosporen auf der gesamten Kulturoberfläche zu den einzelnen Beobachtungszeiten 72 Std., - - - 84 Std., - - - 96 Std., — 120 Std., —•— 144 Std., 156 Std., ——— 168 Std., ——— 190 Std.

sich im 9. Ring 8,75mal soviel Pseudothecien wie Pyknidien. Auch kommen die in der Mitte der Kultur liegenden Pseudothecien zur vollen Ausbildung.

Noch mehr zugunsten der Pseudothecien hat sich das Bild bei pH 7,0 verschoben. Die Pseudothecien umfassende Zone erstreckt sich bereits zu Anfang ihrer Entstehung bei 42 Std auf 7 Ringe. Der Ring mit der stärksten Pseudothecienbildung (40,4mal soviel) ist interessanterweise weiter zum Mittelpunkt der Kultur hin verschoben als bei pH 6,0. Von 60 Std ab liegt das Übergewicht eindeutig im 5., später im 6. Ring.

Eine Verschiebung der Pseudothecienzone nach der Mitte der Kultur zu ist bei pH 8,0 noch mehr ausgeprägt. Der 5. Ring enthält zum Schluß 45,7mal soviel Pseudothecien wie Pyknidien. Dann fällt wie bei den anderen Kulturen die Menge der Pseudothecien gegen außen ab, jedoch hier nur bis zum 7. Ring. Bei Besprechung der Dichte wurde auch schon auf das wenig ausgeprägte Optimum an

dieser Stelle aufmerksam gemacht. Bei der Mycelbildung werden infolge der Ungeeignetheit für die Pyknidienbildung kaum noch Pyknidien dazugebildet.

Ein entsprechender Einfluß ergibt sich auch bei der Verteilung der Chlamydosporen (Abb. 7). Die Bildung beginnt bei p_H 8,0 schon im 4. Ring, bei den anderen p_H -Stufen erst im 8. oder 9. Ring. Von dieser Entstehungszone aus entwickeln sich die Chlamydosporen nach beiden Seiten. Am Ende der Beobachtungszeit umfaßt die Chlamydosporenzone bei p_H 7,0 den 1.—16., bei p_H 6,0 den 5.—16. und bei p_H 5,0 den 7.—15. Ring. Daraus ergibt sich, daß die Chlamydosporenzone

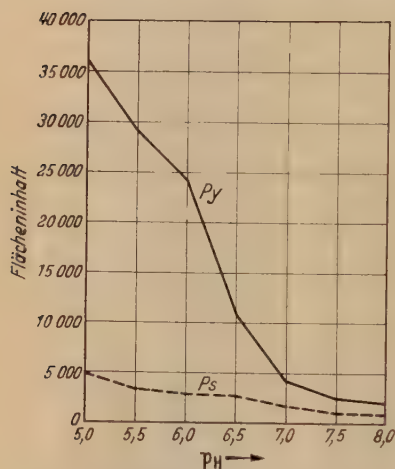


Abb. 8. Mittlere Größe in μ^2 von Pyknidien (P_y) und Pseudothecien (P_s) bei 7 p_H -Stufen.

Jede Kulturserie umfaßte die p_H -Stufen 5,0, 5,5, 6,0 usw. bis 8,0. Alle Kulturen wurden ohne Vorkultur in üblicher Weise beimpft. Sobald die Organe ausgewachsen waren, wurden mit einem Zeichenapparat sämtliche Pyknidien der ersten Serie und sämtliche Pseudothecien der zweiten Serie gezeichnet. Bei der dritten („Chlamydosporenserie“) genügten 800 Chlamydosporen je Kultur. Die gezeichneten Umrisse der Organe wurden dann ausplanimetriert und die gewonnenen Maße in μ^2 umgerechnet.

Pyknidien und Pseudothecien werden kleiner, je alkalischer das Nährmedium ist (Abb. 8). Dabei geht die Abnahme der Organgröße bei den Pyknidien am schnellsten vor sich, ein Beweis mehr für die Ungeeignetheit eines alkalischen bzw. neutralen Nährbodens besonders für die Pyknidien. Aus Abb. 9, in der — nur für drei Kulturen — alle vorkommenden Größen der Chlamydosporen gezeichnet sind, wird ersichtlich, daß auch diese Organe bei Zunahme der Alkalität kleiner werden. Während bei p_H 5,0 der Mittelwert $146,15 \pm 1,4 \mu^2$ beträgt, fällt er bei p_H 6,5 auf $115,34 \pm 1,1 \mu^2$ und erreicht bei p_H 8,0 nur $52,01 \pm 0,54 \mu^2$.

von p_H 8,0 bis p_H 5,0 immer schmaler wird. Bei diesen Versuchen war äußerst bemerkenswert, daß bei p_H 5,0 sich die gesamte Bildungszeit nur über 48 Std erstreckt, bei p_H 6,0 über 72 Std und bei p_H 7,0 sogar über 96 Std. Wie vorstehend schon erwähnt, ist der Beginn der jeweiligen Chlamydosporenbildung verschieden (Tab. 2).

Nach den geschilderten Versuchen ist es an einem bestimmenden Einfluß des p_H auf Pyknidien-, Pseudothecien- und Chlamydosporenbildung kein Zweifel mehr möglich.

Da auch auffällige Größenunterschiede zwischen den gleichen Organen der verschiedenen p_H -Stufen bestehen (Abb. 2), wurde zur genauen Messung je eine Kulturserie für Pyknidien, eine für Pseudothecien und eine für Chlamydosporen angesetzt.

Da auch die Hyphen bei den einzelnen p_H -Stufen, wie man schon makroskopisch sieht, Unterschiede aufweisen, wurden auch sie miteinander verglichen, um festzustellen, ob Beziehungen zwischen Organgröße und Hyphenausbildung bestehen. Schon beim Zeichnen der Haupthyphen — nur diese wurden den Untersuchungen zugrunde gelegt — fiel die stärkere Verzweigung des bei alkalischer Reaktion gewachsenen Mycel auf. Kommt bei p_H 8,0 eine Seitenhyphe auf 1,5 Zellen, so sind es bei p_H 7,0 schon 2,5, bei p_H 6,0 bereits 2,7 und bei p_H 5,0 schließlich 3,5 Zellen. Dadurch entsteht bei Abnahme der Acidität ein viel dichteres

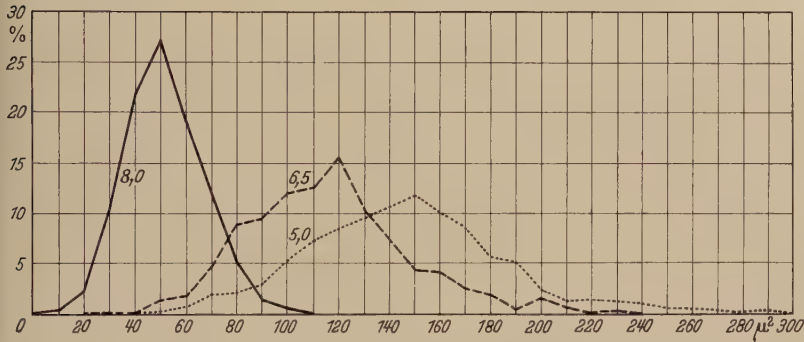


Abb. 9. Variationsbreite der Chlamydosporengröße (Flächeninhalt in μ^2) bei p_H 5,0–8,0.

Mycel. Gleichzeitig werden die Zellen kürzer und schmaler. In Abb. 10 sind die Längen von je 500 Zellen von 4 p_H -Stufen dargestellt. Noch deutlicher wird der Größenunterschied der Zellen, wenn man die Flächen dieser Zellen miteinander vergleicht. In Tab. 4 sind die durch Planimetrieren gewonnenen Größen (Mittelwerte) enthalten. Die Zellgröße nimmt bei den sauren Nährböden zunächst langsam, beim Übergang zur Alkalität

Tabelle 4. Vergleich der Zellgrößen von 4 p_H -Stufen.

	p_H 5,0	p_H 6,0	p_H 7,0	p_H 8,0
Zellgröße	$167,72 \pm 2,81 \mu^2$	$150,42 \pm 2,49 \mu^2$	$66,46 \pm 1,08 \mu^2$	$34,72 \pm 0,54 \mu^2$

schneller ab. Die Zellverkleinerung legt den Gedanken nahe, daß auch die Organe infolge der kleineren Zellen bei p_H 8,0 nicht nur kleiner angelegt werden, sondern auch kleiner bleiben als bei p_H 7,0 und diese wiederum kleiner als bei p_H 6,0 und p_H 5,0. Damit ließe sich auch erklären, daß die aus vielen Zellen zusammengesetzten Pyknidien schneller an Größe abnehmen als die aus weniger Zellen bestehenden und deshalb kleineren Pseudothecien, und die Unterschiede bei den einzelligen Chlamydosporen am geringsten sind.

Mycel und Fortpflanzungsorgane werden also beide kleiner, je weniger sauer bzw. je alkalischer das Medium ist. Demnach scheint ein klarer Zusammenhang zwischen Zellgröße und Organgröße zu bestehen. Wenn hier ein direkter Zusammenhang vorliegt, dann müßten die einzelnen Fortpflanzungsorgane auch bei ihrer Entstehung in Abhängigkeit von den verschiedenen p_H -Stufen verschieden groß angelegt werden. Anderer-

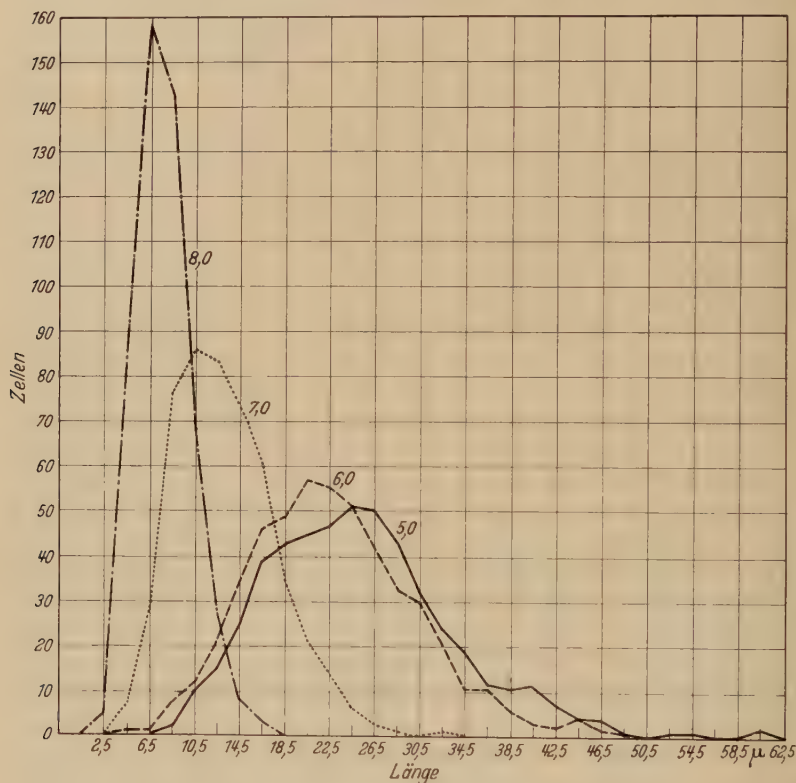


Abb. 10. Variationsbreite der Zelllänge bei p_H 5,0–8,0.

seits hätten die unterschiedlichen Organgrößen ja auch dadurch zustande kommen können, daß die Organe gleichmäßig groß angelegt worden wären, und sich unter der Wirkung der verschiedenen p_H -Stufen in verschiedener Weise weiter entwickelt hätten. Zur Klärung dieser Frage wurden bei einer Kulturserie von vier verschiedenen p_H -Stufen in Intervallen von 6 Std alle in den verschiedenen Ringen erstmals aufgetretenen Pyknidien mit dem Zeichenapparat herausgezeichnet und die mittlere Pyknidiengröße bestimmt (Tab. 5). Es ergibt sich, daß die Pyknidien umso größer angelegt werden, je saurer das Medium ist. Bei

Tabelle 5. Größen (Mittelwerte) der erstmals in einem noch organfreien Ring auftretenden Pyknidien bei 4 verschiedenen p_H -Stufen.

p_H	2. Ring	3. Ring	4. Ring
5,0	7618 μ^2	9603 μ^2	11141 μ^2
5,5	5509 μ^2	9509 μ^2	9378 μ^2
6,0	5117 μ^2	7548 μ^2	9944 μ^2
6,5	3498 μ^2	4187 μ^2	3568 μ^2

jedem einzelnen Ring ergibt sich in Abhängigkeit von der jeweiligen p_H -Stufe dasselbe Bild. (Die absolute Größe der Pyknidien ist in den einzelnen Ringen verschieden, weil, wie in anderem Zusammenhang noch dargelegt wird, außerdem auch die Pyknidiengröße von innen nach außen zunächst zu- und dann wieder abnimmt, also in Form einer Optimumkurve verläuft.) Die relative Abnahme in Abhängigkeit von den einzelnen p_H -Stufen besteht aber unabhängig davon auf jeden Fall. Um die Möglichkeit einer Verwechslung von Pyknidien mit Pseudothecien auf jeden Fall auszuschalten, wurden nur p_H -Stufen bis 6,5 gewählt, bei denen in den inneren Ringen der Kulturen wesentlich mehr Pyknidien als Pseudothecien auftreten. Außerdem sind ja in diesen Kulturen die zuerst erscheinenden Organe wenigstens in den betrachteten Ringen stets Pyknidien.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß sämtliche Organe, wenn auch in verschiedenem Grade, bei Abnahme der Acidität kleiner werden, und daß diese Größenabnahme sich wahrscheinlich auf die gleichzeitig einhergehende Abnahme der Zellbreiten und -längen des Mycels zurückführen läßt.

Wie eingangs bereits gesagt, ist der Beginn der Organbildung auf einem alkalischen Nährboden gegenüber einem sauren verzögert. Diese Verzögerung tritt auf, ganz gleich, ob das Mycel von vornherein auf einem alkalischen Nährboden wächst oder auf einem, der im Verlauf der Kultur alkalisch geworden ist. Da dieses Verhalten des Pilzes anscheinend charakteristisch ist, mußte es näher untersucht werden. Dazu wurden 10 verschiedene p_H -Stufen eines 1%igen Samenschalendekoktes angesetzt. Diese Versuche wurden ohne Vorkultur durchgeführt, da anzunehmen war, daß sich bei einer largsameren Organbildung auch die Verzögerung deutlicher markieren müßte (vgl. SÖRGE 1952). Wie aus dem Verlauf der gestrichelt gezeichneten Kurve von Abb. 11 hervorgeht, besteht zwischen dem Beginn der Organbildung und der cH offenbar eine einfache Beziehung.

Um weitere Beziehungen zu prüfen, wurde erstens die Größenzunahme der Pyknidien und zweitens die Wachstumsgeschwindigkeit des Mycels bestimmt. Die Größenzunahme der Pyknidien wurde an 4 p_H -Stufen so festgestellt, daß sämtliche vorhandenen Pyknidien in einem Zeit-

intervall von je 12 Std gezeichnet und durch Planimetrieren ihre Größen ermittelt wurden. Dabei ergab sich, daß bei jeder einzelnen p_H -Stufe die Zunahme erst langsam, dann schneller erfolgt, um schließlich ganz aufzuhören. Ein Vergleich der p_H -Stufen untereinander zeigt, daß die Pyknidien in den mehr sauren Nährböden schneller an Größe zunehmen.

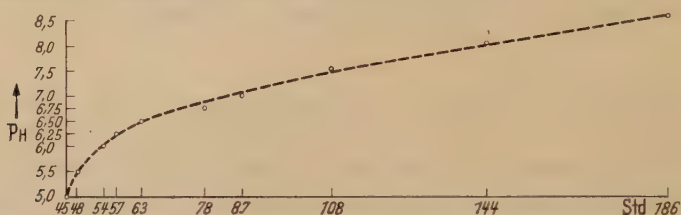


Abb. 11. Beginn der Organbildung auf 10 verschiedenen p_H -Stufen.

als in den alkalischeren. Diese Tatsache besteht, ganz gleich, ob sämtliche zu einem bestimmten Zeitpunkt in den Kulturen vorhandenen Pyknidien (Abb. 12) oder nur die der entsprechenden Ringe miteinander verglichen werden. Im Zusammenhang mit den vorher beschriebenen Versuchen ergibt sich, daß zwischen Verzögerung der Pyknidienbildung

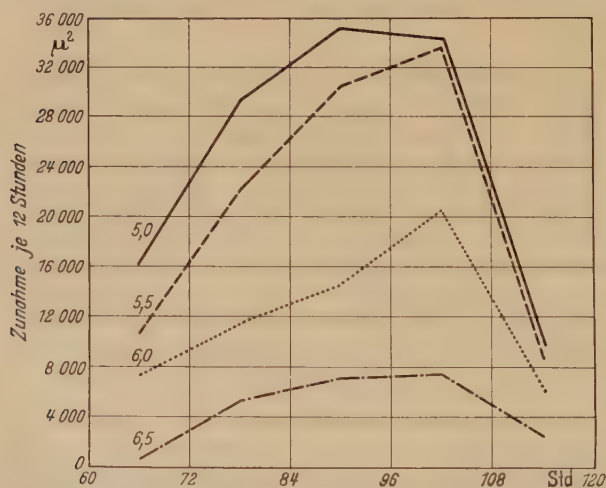


Abb. 12. Größenzunahme sämtlicher in einer Kultur vorhandenen Pyknidien innerhalb von 12 Std bei p_H 5,0—6,5.

und Zunahme der Pyknidiengröße eine gewisse Parallelität besteht. Die Verzögerung der Organbildung kann auch noch an einem anderen Pyknidienmerkmal beobachtet werden. Sofort nach ihrer Bildung sind die Pyknidien, wenn sie auch etwas größer angelegt werden, nicht mit voller Sicherheit von den Pseudothecien zu unterscheiden. Das erste verlässliche Zeichen für Pyknidien ist die Ausbildung der

Öffnung. Diese markiert sich besonders dadurch, daß sie von einem wenige Zellschichten breiten, dunkel gefärbten Ring umgeben wird. Das erste Auftreten dieses Ringes läßt sich als Entwicklungsstadium der Pyknidiendifferenzierung erfassen. Abb. 13 zeigt bei 4 Kulturen die pro-

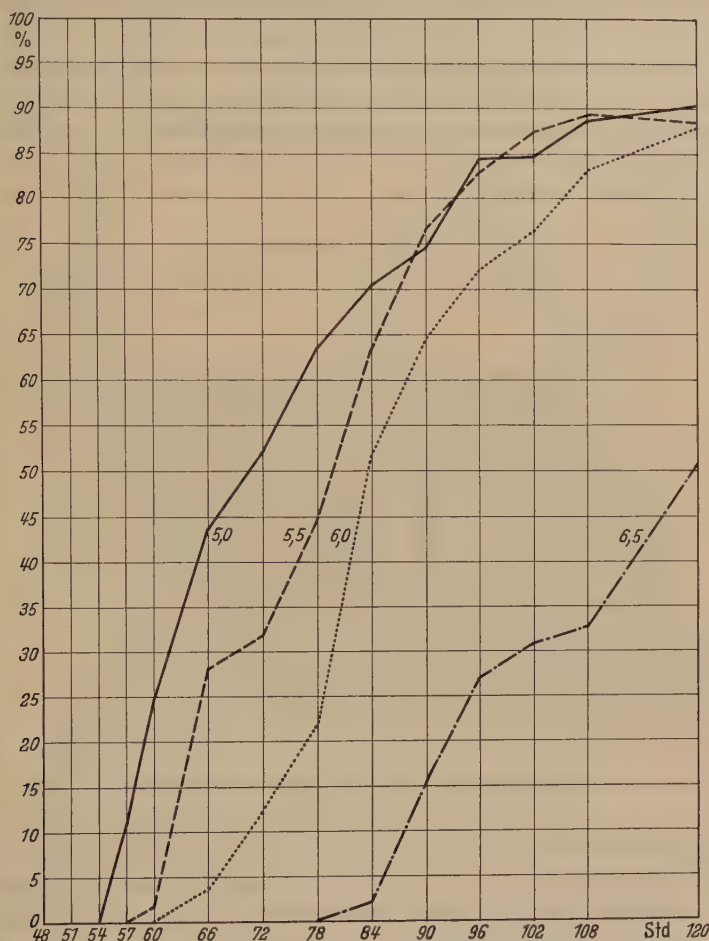


Abb. 13. Prozentsätze der mit einem Ring versehenen Pyknidien bei pH 5,0–6,5.

zentuale Menge der zu der betreffenden Zeit mit einem eben erkennbaren Ring versehenen Pyknidien. Daraus ist zu ersehen, daß, (abgesehen von einem geringen Übereinandergreifen nach 90 Std bei pH 5,0 und pH 5,5) auch dieses Stadium von der Anfangsverzögerung abhängig ist.

Die Wachstumsgeschwindigkeit wurde mit einer an anderer Stelle (SÖRGEL 1952) angegebenen Methode als radiale Ausbreitung des Mycel

planimetrisch bestimmt. Der Versuch wurde mit je 2 Kulturen je pH -Stufe angesetzt und zwar 40 ml Samenschalendekokt und 1,2%o gewässertes Agar in Schalen von 14 cm Durchmesser. Eine Wiederholung des Versuches führte zu dem gleichen Ergebnis. Der Pilz wächst (Abb. 14) bei pH 8,0 und 7,0 erheblich langsamer als bei den beiden anderen Kulturen, doch liegt das Optimum nicht bei pH 5,0, sondern bei 6,0. Die erneute Zunahme des Wachstums nach 144 Std bei den pH -Stufen 5,0, 6,0 und 7,0 ist möglicherweise mit dem Eintritt des Mycel in die Pseudothecienphase zu erklären. Dafür spricht auch das Verhalten der 4. Kultur

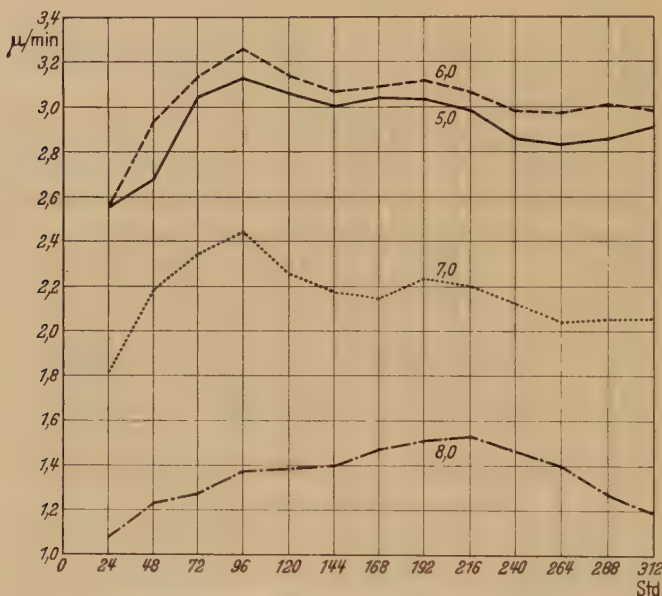


Abb. 14. Wachstumsgeschwindigkeit auf 4 verschiedenen pH -Stufen (5,0–8,0).

(pH 8,0), wo eine eigentliche Pyknidienphase (s. S. 390) nicht zur Ausbildung gelangt, sondern fast nur noch Pseudothecien und Chlamydosporen entstehen. Ein Optimum, welches hier der Pyknidienphase entsprechen würde, ist beim Hyphenwachstum auch nur angedeutet. Die gesteigerte Aktivität des Pilzes, die beim Übergang von einer Phase in eine andere in anderem Zusammenhang bereits als wahrscheinlich hingestellt werden konnte (SÖRGEL 1953), betrifft demnach auch das Wachstum der Hyphen. Legt man dieser Betrachtung nicht die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Hyphen als solche zugrunde, sondern das Längenwachstum einer einzigen Zelle, wie es sich aus dem Mittelwert für die Zelllänge und mittlerer Wachstumsgeschwindigkeit errechnet, so ergibt sich, daß die Querwandbildung gerade bei den alkalischen Stufen am

schnellsten vor sich geht. Dauert es bei p_H 8,0 nur 5,8, bei p_H 7,0 bereits 6,1 min, bis sich die Hyphen um eine Zelle verlängert haben, so sind es bei p_H 6,0 schon 7,6 und bei p_H 5,0 sogar 8,6 min. Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß die Wachstumsgeschwindigkeit wohl eine Rolle bei dem verzögerten Eintritt der Organbildung spielt, aber nicht die alleinige Ursache sein kann, und daß die Zellvermehrung gerade im umgekehrten Verhältnis zur Verzögerung steht.

Wenn nach den bisherigen Ausführungen als feststehend angesehen werden kann, daß die Organbildung wesentlich von der Konzentration

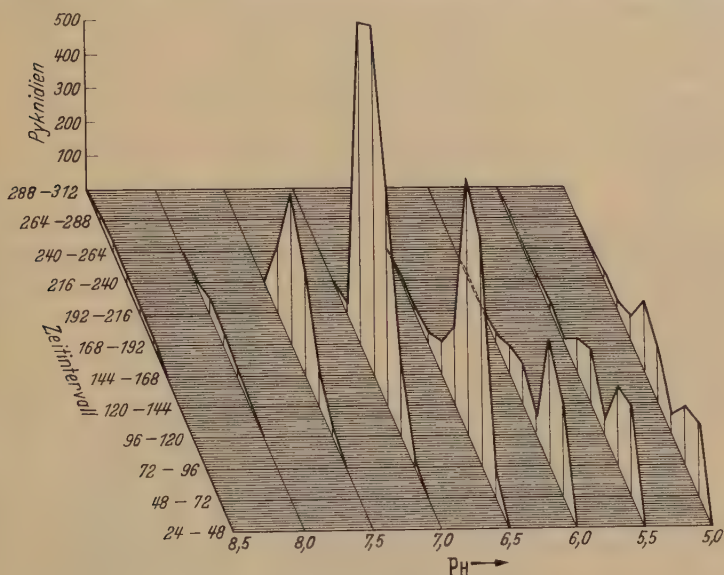


Abb. 15. Zunahme der Pyknidien in einem 24stündigen Zeitintervall in Abhängigkeit vom p_H (3dimensionale Wiedergabe).

der Wasserstoffionen in der Nährlösung beeinflusst wird, so war die Frage bislang noch offen geblieben, ob auch die Aufeinanderfolge der einzelnen Phasen darauf zurückgeführt werden kann. Zur Klärung wurde eine Serie von Kulturen mit 10 verschiedenen p_H -Stufen eines 1%igen Samenschalendekoktes angesetzt und laufend kontrolliert. Abb. 15 gibt den Verlauf der 24stündigen Zunahme der Pyknidien bei 8 dieser Kulturen wieder. Als erstes wesentliches Merkmal fällt auf, daß bei p_H 5,0, desgleichen bei p_H 5,5 und 6,0 nicht nur ein Optimum vorhanden ist, sondern zwei Optima auftreten. Dabei wird das zweite Optimum von p_H 5,0 über p_H 5,5 nach p_H 6,0 immer kleiner. Bei den folgenden Stufen ist nur noch ein Optimum vorhanden, welches aber zeitlich um so weiter hinausgeschoben wird, je alkalischer die Reaktion der Nährlösung ist. Liegt das

erste Optimum von p_H 5,0 und p_H 5,5 zwischen 48 und 72 Std, so liegt es bei p_H 6,0 und bei der nicht mit abgebildeten Stufe von 6,25 bei 72—96 Std. Bei p_H 6,5 ist es um weitere 24 Std verschoben. Ein Sprung von 48 Std liegt beim Übergang von p_H 6,5 nach 7,0. Dann kommen jeweils 24 Std

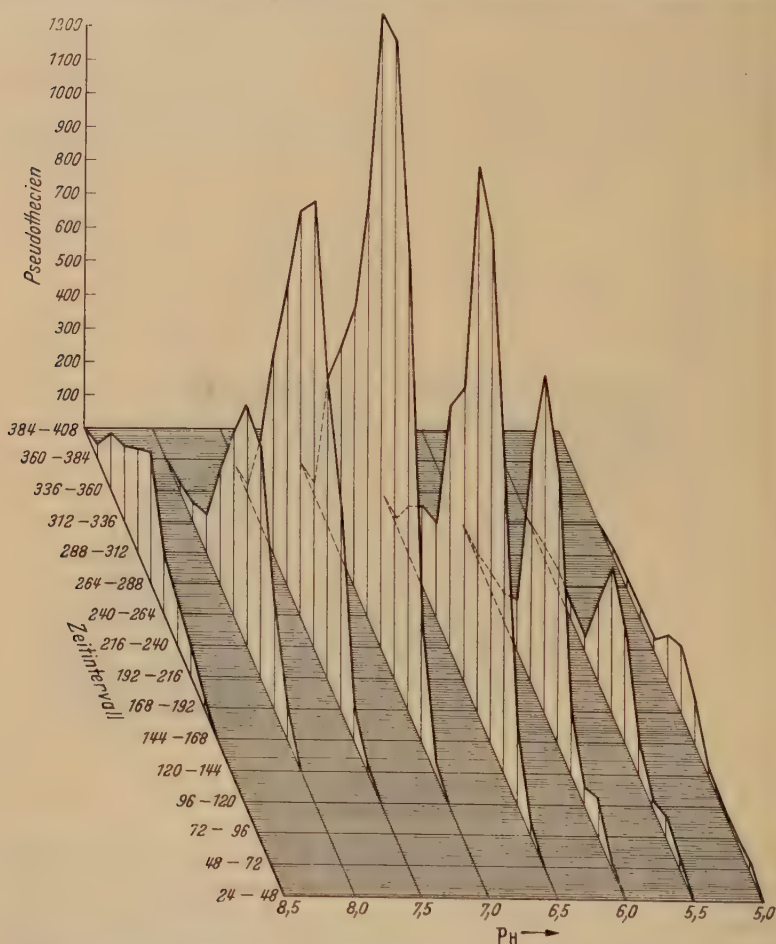


Abb. 16. Zunahme der Pseudothecien in einem 24stündigen Zeitintervall in Abhängigkeit vom p_H (3 dimensionale Wiedergabe).

dazu, bis schließlich bei p_H 8,5 zwischen 240 und 264 Std ein eben noch erkennbares Optimum zu verzeichnen ist. Doch werden in diesem p_H -Bereich nur noch derart wenig Pyknidien gebildet, daß die Berechtigung, von einer Phase zu sprechen, kaum noch besteht.

Die Pseudothecienbildung (Abb. 16) verläuft bei den drei ersten der abgebildeten p_H -Stufen ähnlich wie bei den Pyknidien: auch hier treten

zwei Optima auf. Doch ist im Gegensatz zur Pyknidienphase das erste Optimum wesentlich geringer entwickelt als das zweite und überdies bei der sauersten Stufe am geringsten. Die eigentliche Pseudothecienphase jedoch beginnt mit dem zweiten Optimum, welches bei den vier ersten p_H -Stufen einheitlich zwischen 168—192 Std liegt. Dann beginnt auch bei der Pseudothecienbildung eine zeitliche Verschiebung. Dabei geht schließlich die Pyknidienphase fast vollständig in der Pseudothecienphase auf, so daß ohne Kenntnis der Verhältnisse bei den anderen p_H -Stufen eine Einteilung in zwei getrennte Abschnitte für die Ausbildung dieser beiden Organe kaum zu erkennen gewesen wäre. Von p_H 5,0 bis 8,5 rücken die Optima zeitlich immer mehr zusammen (Tab. 6).

Tabelle 6. *Zeitlicher Abstand zwischen den Optima der Pyknidien- und Pseudothecienphase bei 8 p_H -Stufen.*

	p_H 5,0	p_H 5,5	p_H 6,0	p_H 6,5	p_H 7,0	p_H 7,5	p_H 8,0	p_H 8,5
Stunden	120	120	96	72	48	48	24	24

Was die beiden Optima bei der Pyknidienbildung betrifft, so ist auffällig, daß diese Pyknidien gerade dann entstehen, wenn die Pseudothecienphase beginnt. Während dieser zweiten Phase, in der eigentlich nur Pseudothecien gebildet werden sollten, kommt es gleichzeitig mit der Pseudothecienbildung noch einmal zur Entstehung von Pyknidien. Daraus geht hervor, daß die Bedingungen für die Bildung der Pseudothecien derart ungünstig liegen müssen, daß statt der erwarteten Pseudothecien Pyknidien entstehen. Dem entspricht auch das weniger stark ausgeprägte zweite Optimum bei p_H 5,5 und 6,0.

Die niedrigen Optima für die Pseudothecien während der Pyknidienphase zeigen, daß stets eine bestimmte Menge dieser Organe neben den Pyknidien entsteht und zwar erhält man für p_H 5,0 rund 7%, für p_H 5,5 rund 17% und für p_H 6,0 fast 24%. Gut dazu paßt die Pyknidienzahl, die auf einem Normalnährboden (SÖRGEL 1953) erhalten wurde. Dort waren es 13% bei einem p_H zwischen 5,0 und 5,5, welches die nicht gepufferte Nährlösung während der Pyknidienphase hatte.

Zwischen der Zahl der Organe, die bei den eben besprochenen Kulturen und den zu Anfang beschriebenen mit Vorkultur (auf niedrigprozentigem Nährboden) erhalten worden war, scheint eine gewisse Diskrepanz zu bestehen. Dort war nämlich die Zahl der Pyknidien bei Abnahme der Acidität geringer geworden, hier war jedoch bis p_H 7,0 ein Anstieg zu verzeichnen. Das Optimum der Pseudothecien und auch der Chlamydosporen dagegen war bei beiden Kulturverfahren gleich. Berechnet man aber, ausgehend von den insgesamt gebildeten Organen (Pyknidien + Pseudothecien), wieviel Prozent Pseudothecien gebildet werden, so stimmen diese Prozentzahlen bei beiden Kulturverfahren weitgehend

überein. Während es bei p_H 5,0 mit Vorkultur 47%, ohne Vorkultur 40% Pseudothecien sind, steigt ihr Anteil an den gebildeten Organen in beiden Fällen bis p_H 8,0 auf 98% an. Wir haben demnach bei den zuletzt besprochenen Kulturen grundsätzlich dasselbe Verhalten vor uns. Der Pilz reagiert allerdings mit Vorkultur insofern anders, als die charakteristische Reaktion schneller und schärfer ausgeprägt in Erscheinung tritt.

Berechnet man sowohl für die Pseudothecien als auch für die Pyknidien aus der bei jeder p_H -Stufe gebildeten Anzahl und ihrer Größe die gesamte Fläche, die von jedem dieser Organe eingenommen wird, so bekommt man für die Pseudothecien eine typische GAUSSSCHE Normalverteilung, wobei die experimentell ermittelten Werte nur unwesentliche

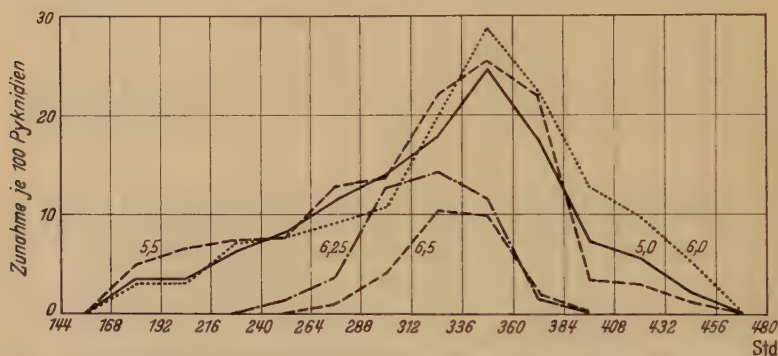


Abb. 17. Zunahme der Pyknidienpseudothecien je 100 Pyknidien während eines Zeitintervalles von 24 Std bei p_H 5,0–6,5.

Abweichungen zeigen. Daraus geht noch einmal ganz deutlich hervor, daß bei Konstanthaltung bestimmter Außenbedingungen und Veränderung nur eines Faktors, wie in unserem Falle der Konzentration der Wasserstoffionen, der Beweis für die Abhängigkeit von diesem Faktor erbracht werden kann. Bei den Pyknidien wird die von ihnen eingenommene Fläche von p_H 5,0 bis p_H 8,0 immer kleiner. Auch hier würde man eine Normalverteilung erhalten, wenn man für die ersten drei p_H -Stufen nur die während des ersten Optimums der Pyknidienphase gebildeten Pyknidien zugrunde legen würde.

Außerhalb unserer Betrachtungen waren bisher die auf den Pyknidien sich bildenden Pseudothecien geblieben (SÖRGE 1953). Bei den zuletzt behandelten Kulturen wurden auch diese mitgezählt, ihre Menge stieg bis p_H 6,0 an, fiel dann aber schnell ab. Bei p_H 7,0 waren nur noch ganz verstreut einige Pyknidien mit Pseudothecien besetzt. Da die Zahl der Pyknidien in den einzelnen Kulturen unterschiedlich ist, wurde der Besatz je 100 Pyknidien für jede Kultur errechnet (Abb. 17).

Unsere Untersuchungen führten demnach zu folgender Feststellung: Bei Abnahme der Acidität wird das Optimum der Pyknidien-

und Pseudothecienphase verzögert. Dabei verschmelzen infolge der weniger schnellen Verzögerung der Pseudothecienphase beide Phasen fast vollständig. Bei alkalischer Reaktion ist die Pyknidienphase kaum noch als solche nachweisbar. Eine Verschiebung erfährt auch die Phase der „Pyknidienpseudothecien“. Diese erlischt jedoch schon bei neutraler Reaktion.

Bei den bisherigen Versuchen wurde in einer Kultur stets die Reaktion eines Mycels für jeweils eine bestimmte p_H -Stufe untersucht, so daß die Reaktion der einzelnen Mycelien dann miteinander verglichen werden konnte. Die Filtrierpapiermethode bietet aber noch die Möglichkeit, die Wirkung unterschiedlicher Nährlösungen auf ein und dasselbe Mycel zu prüfen. Das Papier läßt sich mit dem anhaftenden Mycel ohne erkennbare Störung auf ein anderes Substrat übertragen (SÖRGE 1952). Auf diese Art und Weise gelingt es, bei wachsenden Mycelien den Nährboden beliebig zu wechseln. Nach den bisherigen Ergebnissen müßte das gleiche Mycel je nach der cH dabei einmal mit Pyknidien-, einmal mit Pseudothecienbildung reagieren.

Von zwei Kulturen, die bei p_H 5,0 bis 96 Std unberührt im Thermostaten stehen blieben, wurde die eine auf p_H 5,0, die andere auf p_H 8,0 übertragen. Bei der nach Substratwechsel sofort vorgenommenen Zählung hatte die erste Kultur 524, die andere 457 Pyknidien. Schon nach 3 Std ließ sich eine Wirkung des neuen Substrates feststellen (Abb. 18): Die Zahl der Pyknidien hatte bei p_H 5,0 um 7,44%, bei p_H 8,0 dagegen um nur 1,71% zugenommen. Nach weiteren 3 Std war der Unterschied noch größer geworden, und nach 9 Std hatte bei p_H 8,0 die Pyknidienbildung vollständig aufgehört. Bei p_H 5,0 war sie nicht nur weitergegangen, sondern auch um ein Vielfaches gesteigert. Die Ausgangszahl der Pseudothecien war bei der auf p_H 8,0 übertragenen Kultur 19, bei der anderen 16. Bei der für die Pyknidienbildung ungünstigen Stufe von p_H 8,0 steigerte sich das Auftreten der Pseudothecien mehr als bei der weniger günstigen.

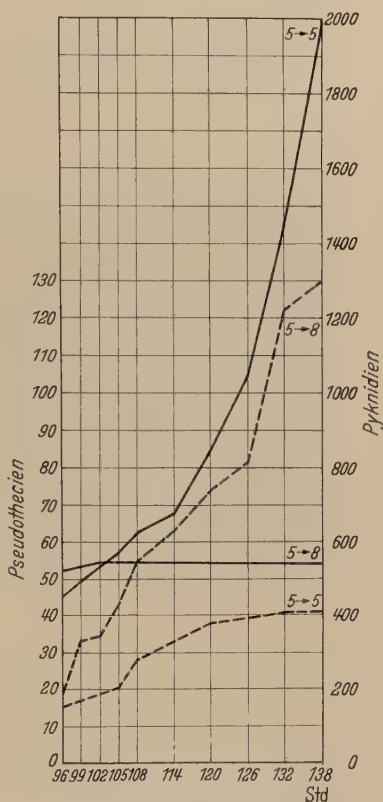


Abb. 18. Pyknidien- (—) und Pseudothecienbildung (---) bei Wechselkulturen.

Noch aufschlußreicher waren Versuche, bei denen der Nährboden nicht nur einmal, sondern wiederholt gewechselt wurde. Auf eine ins Einzelne gehende Beschreibung des folgenden Versuchs kann verzichtet werden, da die auf p_H 5,0 herangezogenen Kulturen mit dem gleichen Ergebnis wie im vorigen Versuch auf p_H 8,0 bzw. 5,0 übertragen wurden. Das Substrat beider Kulturen wurde dann aber noch einmal gewechselt, so daß sich die eine Kultur 3mal auf p_H 5,0 befand (Abb. 19 links) und die andere zunächst auf p_H 5,0 herangezogen und dann über p_H 8,0 wieder auf p_H 5,0 übertragen wurde (Abb. 19 rechts). Während bei der ersten dieser beiden Kulturen dauernd neue Pyknidien mit nur wenig Pseudothecien entstanden, begann nach dem zweiten Wechsel bei der anderen Kultur erneut

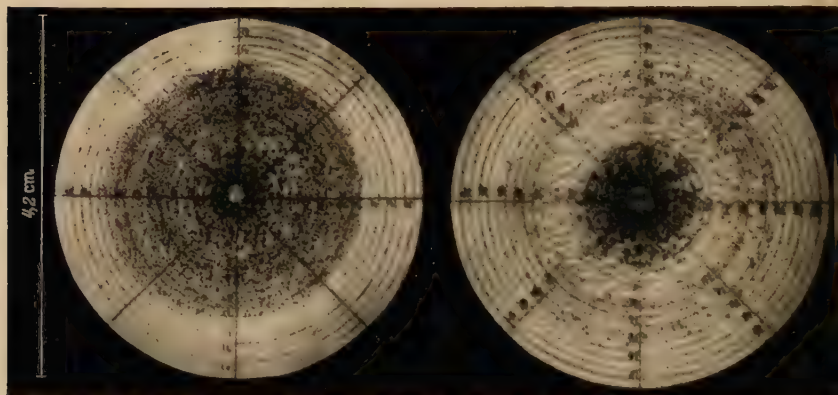


Abb. 19. Photographische Wiedergabe zweier Wechselkulturen (nähere Erklärung im Text).

die Pyknidienbildung. Doch unterschied sich das auf p_H 8,0 übertragene Mycel ganz auffällig durch die Ausbildung sehr vieler Lufthyphen, die sich aber nur auf dem Teil der Kultur entwickelten, wo der Pilz unter dem Einfluß der alkalischen Nährlösung gestanden hatte. Auf dieses sich bei alkalischer Reaktion bildende Luftmycel wurde schon auf S. 375 aufmerksam gemacht und ein Vergleich mit Hilfe der sich darin bildenden Chlamydosporen vorgenommen. (Die Zahl dieser Chlamydosporen als Maß für die Dichte des Luftmycels zu verwenden, ist, wie wir jetzt wissen, nur deshalb bedingt zu verwerten, weil bei alkalischer Reaktion die Chlamydosporenbildung an sich gesteigert ist.)

Bei einer weiteren Kultur, die zunächst von p_H 5,0 auf p_H 6,5 übertragen wurde, ging die auf p_H 5,0 begonnene Entwicklung noch einige Zeit weiter, ehe ein deutlicher Einfluß (36 Std nach dem Substratwechsel) zu erkennen war. Hierbei entwickelten sich erwartungsgemäß sowohl Pyknidien als auch Pseudothecien in ziemlich großer Zahl. Als die Kultur dann noch einmal auf p_H 8,0 übertragen wurde, ging auch

dieses Mal die Entwicklung noch einige Stunden weiter, ehe die Wirkung der neuen p_H -Stufe sich in einem Aufhören der Pyknidienbildung und einer Verlangsamung der Pseudothecienentstehung zu erkennen gab. Dabei trat eine merkwürdige „Umwandlung“ von Organen auf. Organe, die schon relativ weit entwickelt waren und ihrem ganzen Aussehen nach für Pyknidien gehalten wurden, stellten ihr Wachstum ein und enthielten später Ascosporen.

Auch der umgekehrte Fall wurde beobachtet. Bei einer Kultur, die von p_H 5,0 auf p_H 6,5, dann aber wieder auf p_H 5,0 übertragen wurde, wuchsen aus den Pseudothecienanlagen Pyknidien hervor. Bei solchen Pyknidien waren noch nach ihrer vollkommenen Ausbildung seitlich dunkelgefärbte Reste des Pseudothecienstromas vorhanden. Als diese Kultur dann noch einmal auf p_H 8,0 übertragen wurde, konnte weiter außen wiederum die eben erwähnte Pseudothecienentstehung aus Pyknidienanlagen verfolgt werden. Dasselbe war auch der Fall bei einer Kultur, bei der das Substrat 3mal gewechselt wurde. Jedesmal trat die erwartete Reaktion ein (von p_H 5,0 auf p_H 8,0, dann auf p_H 5,0 und wieder auf p_H 8,0).

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß der Einfluß der Konzentration der Wasserstoffionen auf die Ausbildung der Fortpflanzungsorgane so erheblich ist, daß beim Übertragen ein und desselben Mycels auf eine andere p_H -Stufe sofort das für die betreffende Stufe charakteristische Verhältnis von Pyknidien zu Pseudothecien hergestellt wird. Dabei wird sogar eine begonnene Entwicklung nicht nur nicht zu Ende geführt, sondern an Stelle von Pyknidienanlagen entstehen Pseudothecien bzw. von Pseudothecienanlagen Pyknidien.

In zahlreichen an den verschiedensten Objekten ausgeführten Untersuchungen war immer wieder gefunden worden, daß die Konzentration der Wasserstoffionen einen erheblichen Einfluß auf die vegetative Entwicklung von Pilzen hat. Die schon alte Erkenntnis, daß Pilze im allgemeinen mehr saures Substrat bevorzugen, konnte damit bestätigt werden. Unsere Wachstumsmessungen an *Mycosphaerella pinodes* fügen sich in diesen Rahmen ein.

Eine durch den Einfluß der Konzentration der Wasserstoffionen bewirkte Gestaltsänderung an Hyphen verschiedener Pilze wurde schon von WEHLBURG (1932) besonders an *Ascochyta pisi* und von LILLY und BARNETT (1947) bei *Sordaria fimicola* sowie SHARP und SMITH (1952) an Keimschläuchen der Teleutosporen von *Puccinia coronata avenae* beobachtet. Wiederholt wurde auch über eine Änderung des p_H -Wertes im Nährboden durch wachsende Mycelien berichtet (LUDWIG 1928, WEHLBURG 1932, GIRBARDT 1952 u. a.). LILLY und BARNETT (1951) stellten fest, daß bei *Aspergillus rugulosus* bei p_H 6—8 viele Perithezien und wenig Conidien, bei p_H 3—4 keine Perithezien, aber viele Conidien gebildet werden. Dieselben Autoren fanden (1947), daß bei *Sordaria fimicola* bei p_H unter 6,5 keine Perithezien entstehen. Nach ROBBINS und SCHMITT (1945) ist auch die Zygosporienbildung von

Phycomyces blakesleeana vom pH-Wert abhängig. Keinen Einfluß auf die Organbildung stellt ARONESCU (1933) bei *Neurospora sitophila* und GIBBARDT (1952) bei *Neurospora crassa* fest.

Außerordentlich deutlich dagegen ist das Verhalten unseres Pilzes, da jedes der drei Fortpflanzungsorgane anders reagiert. Diese Befunde erweitern unser Verständnis über die Fruchtkörperbildung und es ist anzunehmen, daß eine solche Wirkung beim Vorkommen der Pilze in der Natur sowohl der Saprophyten als auch der Parasiten eine gewisse nicht zu unterschätzende Rolle spielt. Einen Hinweis auf das Bestehen solcher Beziehungen geben auch die Untersuchungen von WARCUP (1951) über die Verbreitung von Basidiomyceten. Sowohl das Auftreten einzelner Arten als auch die Artenzahl selbst ist nach abhängig vom pH-Wert des Bodens. Die endgültige Klärung der Biologie eines parasitischen Pilzes an Kulturpflanzen kann auch für die Resistenzzüchtung neuer Möglichkeiten eröffnen.

Erl. M. HELLMUTH möchte ich auch an dieser Stelle für ihre wertvolle Hilfe bei den Untersuchungen meinen herzlichen Dank aussprechen.

Zusammenfassung.

Die Ausbildung der verschiedenen Fortpflanzungsorgane von *Mycosphaerella pinodes* ist von der Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösung abhängig.

Für die Pyknidienbildung ist saure Reaktion am günstigsten. Pseudothecien entstehen optimal bei neutraler Reaktion. Alkalische Reaktion fördert die Ausbildung der Chlamydosporen.

Bei Abnahme der Acidität tritt eine Verzögerung im Beginn der Organbildung auf.

Je alkalischer das Medium wird, umso stärker wird die Bildung der Lufthyphen.

Alle Fortpflanzungsorgane nehmen bei Abnahme der Acidität an Größe ab. Zurückzuführen ist diese Verkleinerung wahrscheinlich auf eine Abnahme der Längen und Breiten der Zellen.

Bei Abnahme der Acidität tritt die Pyknidienphase später auf. Nicht so schnell verschiebt sich die Pseudothecienphase, so daß bei alkalischer Reaktion beide Phasen ineinander übergehen.

Bei saurer Reaktion treten während der Pseudothecienphase noch einmal Pyknidien auf.

Aus Pyknidienanlagen können sich bei plötzlicher Änderung der Wasserstoffionenkonzentration Pseudothecien, aus Pseudothecienanlagen Pyknidien entwickeln.

Literatur.

ARONESCU, A.: Further studies in *Neurospora sitophila*. Mycologia 25, 43 (1933). — GIBBARDT, M.: Zur Frage der Fertilität bei *Neurospora crassa* und *Neurospora tetrasperma* in Abhängigkeit von Außenfaktoren. Flora 139, 477 (1952).

— LILLY, V. G., and H. L. BARNETT: The influence of p_H and certain growth factors on mycelial growth and perithecial formation by *Sordaria fimicola*. Amer. J. Botany **34**, 131 (1947); Physiology of the fungi. McGraw-Hill Book Company, Inc. (1951). — LUDWIG, O.: Untersuchungen an *Ascochyta pisi* Lib. Beiträge zur Biologie der Pflanzen **16**, 465 (1928). — ROBBINS, W. J., and M. B. SCHMITT: Factor Z_2 and gametic reproduction by *Phycomyces*. Amer. J. Botany **32**, 320 (1945). — SHARP, E. L., and F. G. SMITH: The influence of p_H and zinc on vesicle formation in *Puccinia coronata avenae* Corda. Phytopathology **42**, 581 (1951). — SÖRGEL, G.: Über eine neue Kulturmethode für Mikroorganismen. Der Züchter **21**, 322 (1951); Über die Ursachen der unterschiedlichen Resistenz verschiedener Erbsensorten gegenüber den Fußkrankheitserregern *Ascochyta pisi* Lib., *Ascochyta pinodella* Jones und *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox.) Stone. I. Vergleichende Untersuchungen der Pilze auf einer stark und einer schwach anfälligen Sorte. Der Züchter **22**, 4 (1952); Über den Entwicklungsgang von *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox.) Stone. I. Die Bildung der Fortpflanzungsorgane in „normalen“ Kulturen. Arch. Mikrobiol. **19**, 247 (1953). — WEHLBURG, C.: Onderzoekingen over Erwtantrhknose. Proefschrift, Baarn, 63 S. (1932). — WARCUP, J. H.: Studies on the growth of Basidiomycetes in soil. Annals of Botany, N. S. **15**, 305 (1951).

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen.)

Über antibiotische Stoffe bei den Grünalgen *Stichococcus bacillaris* und *Protosiphon botryoides*.

Von

RICHARD HARDER und ADOLF OPPERMAN.

(Eingegangen am 24. Juli 1953.)

Über die Bildung antibiotischer Stoffe durch Bakterien, Pilze und höhere Pflanzen liegt schon eine fast unübersehbare Zahl von Mitteilungen vor. Ob auch Algen antibiotische Stoffe ausscheiden, ist nicht so häufig untersucht worden. Schon bei unseren Arbeiten über die Massenkultur von Diatomeen und einzelligen Grünalgen (HARDER u. VON WITSCH 1941, 1942) fiel uns auf, daß die Kulturen auch bei Durchblasen nicht sterilisierter und ungereinigter Luft überraschend artrein bleiben, so daß man ganz den Eindruck hatte, daß antibiotische Stoffe von den Algen ausgesondert würden. Bereits früher, uns damals noch nicht bekannt, hat LEFÈVRE (1937), wie aus seiner Publikation von 1952 (LEFÈVRE, JAKOB u. NISBET) hervorgeht, antibiotische Wirkungen gewisser Algen (z. B. *Cosmarium*) auf verunreinigende Bakterien in künstlichen Kulturen beobachtet. LEFÈVRE und Mitarb. (1952) verweisen auch auf Beobachtungen von LACKEY (1941), LESAGE (1945) und FELLER (1948), aus denen auf antibiotische Wirkungen von Algen auf Bakterien und andere Organismen zu schließen ist. Über das Vorkommen eines Antibioticums bei der Rotalge *Corallina* hat HAAS (1950) berichtet. Sehr ausführlich haben LEFÈVRE, JAKOB und NISBET (1952) die gegenseitige Beeinflussung von Algen durcheinander in vitro wie in natürlichen Gewässern untersucht. Mit dem Problem „Wirkung von Alge auf Alge“ hat sich auch v. DENFFER (1948) gründlich befaßt und bei *Nitzschia palea* ein als Mitosegift wirkendes Autotoxin gefunden. Auch die Untersuchungen von PRATT (1940, 1942) an *Chlorella*, die zur Aufdeckung des Antibioticums Chlorellin geführt haben, gingen ursprünglich von Selbsthemmungen in *Chlorella*-Kulturen aus. Das Chlorellin und seine Wirkung in verschiedenster Richtung unter Einschluß von sogar Tierversuchen ist dann von einer Gruppe amerikanischer Forscher in muster-gültiger Weise durchuntersucht worden (PRATT 1940, 1942, PRATT u. FONG 1940, PRATT, DANIELS, EILER, GUNNISON, KUMMLER, ONETA, SPOEHR, HARDIN, MILNER, SMITH u. STRAIN 1944, SPOEHR 1945, SPOEHR, SMITH, STRAIN, MILNER u. HARDIN 1949). In Deutschland hat KLOSA (1949) aus grünen Algen (die Art bzw. die Arten wurden nicht bestimmt)

von Baumrinden ein gegen Staphylokokken, Streptokokken und Colibacillen, schwächer gegen Tuberkelbacillen, wirksames Antibioticum extrahiert.

Experimenteller Teil.

Stichococcus bacillaris Naeg. 397/1b¹, *Stichococcus mirabilis* Lagerh. 379/3, *Hormidium Barlowi* Pringsheim 335/1a, *Hormidium flaccidum* A.Br. 335/2a, *Coelastrum proboscideum* Bohlin var. *gracile* Vischer 217/3 und *Protosiphon botryoides* 731/1 wurden in einer Nährlösung mit 0,15% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,03% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,06% KH_2PO_4 und FeCl_3 in Spuren in 250 cm³-Rundkolben, in die 100 cm³ Nährlösung gegeben wurden, in absoluter Reinkultur gezüchtet. Die Kulturen standen bei Zimmertemperatur in der Nähe des Fensters im diffusen Tageslicht. Nach 5-wöchigem Wachstum wurde die Kulturlösung durch ein Membranfilter steril abfiltriert und im Vakuum bei 35° C auf ein Zehntel eingengt. Die Filtrate zeigten im Lochtest keinerlei Wirkung auf *Bacillus mycoides*, *Staphylococcus aureus*, *Bacterium coli* und *Pseudomonas pyocyanea*.

Um die Entwicklungsbedingungen für die Algen zu verbessern, wurden zwei von ihnen, nämlich *Stichococcus bacillaris* und *Protosiphon botryoides*, folgendermaßen weiterkultiviert: Sie kamen in 1000 cm³-Rundkolben, die mit 1 Liter Nährlösung nach SPOEHR, SMITH, STRAIN, MILNER und HARDIN (1949), nämlich 4,9 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,41 g KH_2PO_4 , 2,53 g KNO_3 und 0,0013 g $\text{FeSO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ in 1000 cm³ aqua bidest. (pH 5,8), gefüllt waren und nicht im Tageslicht, sondern bei künstlicher Dauerbelichtung (in 30 cm Abstand von einer wassergekühlten 1000 Watt-Birne) aufgestellt wurden. In die Kolben wurde durch ein bis zum Boden gehendes Glasrohr ein ständiger Strom von steriler Luft eingblasen, wodurch nicht nur die Gasversorgung gut war, sondern auch das Absetzen der Algen am Grunde des Kolbens verhindert wurde. Das Wachstum war erheblich besser als in den nicht belüfteten Tageslichtkulturen.

Nach dreiwöchiger Kultur wurden die Algenzellen wieder durch ein Membranfilter steril von der Lösung abfiltriert und diese anschließend im Vakuum bei 35° C auf ein Dreißigstel ihres Volumens eingengt. Die wasserklaren Lösungen wurden beim Einengen gelblich und bekamen eine öltartige Konsistenz; ihr pH-Wert sank dabei bei *Stichococcus* auf 4,7 und bei *Protosiphon* auf 5,2.

Beide Lösungen erwiesen sich im Lochtest als antibiotisch wirksam gegen grampositive wie gramnegative Bakterien, wobei die *Stichococcus*-Flüssigkeit einen stärkeren Effekt zeigte als die von *Protosiphon*. Die zur Kontrolle ebenfalls auf ein Dreißigstel eingengte frische Nährlösung, die nicht mit Algen beimpft worden war, zeigte keine Hemmwirkung

¹ Die Kulturen stammen aus der Sammlung von E. G. PRINGSHEIM; die Nummern hinter den Namen sind die Sammlungsbezeichnungen.

auf die Testbakterien. Beide Algenstoffe wirkten nur bakteriostatisch, nicht baktericid. Auf *Pseudomonas pyocyanea* übten beide Lösungen nach anfänglicher Wachstumshemmung später sogar eine wachstumsfördernde Wirkung aus.

Tabelle 1. Hemmung von Testbakterien im Lochtest durch das eingedickte Filtrat von *Stichococcus aureus* und *Protosiphon bacillaris*.

Testbakterium	Hemmzonenbreite (mm) u. Typus ¹	
	<i>Stichococcus</i>	<i>Protosiphon</i>
<i>Bacillus mycoides</i>	9 H ₂	6 H ₂
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 H ₂	2 H ₃
<i>Bacterium coli</i>	7 H ₂	2 H ₂
<i>Pseudomonas pyocyanea</i>	5 H ₂	1 H ₃

Bei der Untersuchung des Chlorellins haben SPOEHR und Mitarb. (1949) Hemmungsringe bei *Staphylococcus aureus* bis zu 30 mm Breite erhalten; die Methodik war aber eine andere, so daß man die Zahlen nicht direkt mit unseren vergleichen kann.

Die Ausbildung der Hemmzonen H₂ und H₃, die keinen scharfen Rand haben, weisen darauf hin, daß die antibakterielle Wirkung nicht etwa auf die Bildung von H₂O₂ zurückzuführen ist wie z. B. beim Notatin. Die Ansäuerung beim Einengen, starke Reduktionswirkung der Flüssigkeit, Gelblichwerden der Lösung beim Stehen an der Luft und der typische, leicht ranzige Geruch der beiden Lösungen weisen darauf hin, daß in beiden ungesättigte Fettsäuren vorhanden sind, wie sie auch von SPOEHR und Mitarb. (1949) bei *Chlorella* als wirksame Komponente gefunden worden sind. Bei Verwendung von unschwer zu beschaffenden Fettsäuren anderer Herkunft erhielt die SPOEHRsche Arbeitsgruppe gleichstarke antibiotische Wirkungen wie mit dem Chlorellin. Eine Verwendung der *Chlorella*-Ausscheidungen für die Praxis hat daher wohl wenig Aussicht, es sei denn, daß sie — die zweifellos aus einer Mischung verschiedener Stoffe bestehen — sich noch in anderen als den bisher durchuntersuchten Richtungen als wirksam erwiesen. Nicht anders dürfte es bei den Substanzen aus den *Stichococcus*- und *Protosiphon*-Kulturen sein, bei denen mindestens ein Teil der antibakteriellen Eigenschaften wohl auch ungesättigten Fettsäuren zugeschrieben werden muß; es könnten aber auch wohl noch andere Substanzen vorhanden sein.

¹OPFERMANN (1951) hat beim Lochtest 9 Typen von Hemm- bzw. Förderungs- zonen unterschieden, von denen hier H₂ und H₃ auftraten. Es bedeutet H₂: in der Nähe des Loches wachsen überhaupt keine Bakterien; in einiger Entfernung treten Kolonien auf, die mit zunehmendem Abstand vom Lochrand immer größer werden. H₃: auch direkt am Rande des Loches entwickeln sich Bakterienkolonien; sie bleiben aber zunächst klein und wachsen langsam, nach 2—3 Tagen sind sie dann aber größtenteils nicht mehr gehemmt; diese Zone geht nach außen allmählich in das Gebiet mit normalem Wachstum über.

Zusammenfassung.

In von *Stichococcus bacillaris* und *Protosiphon botryoides* bewachsenen Nährlösungen ließen sich nach Einengen im Lochtest antibiotische Stoffe gegen *Bacillus mycoides*, *Staphylococcus aureus*, *Bacterium coli* und *Pseudomonas pyocyanea* nachweisen. Sie wirkten bakterio statisch, nicht bactericid und enthalten als wirksame Komponente wahrscheinlich ungesättigte Fettsäuren.

Literatur.

DENFFER, D. v.: Über einen Wachstumshemmstoff in alternden Diatomeenkulturen. Biol. Zbl. **67**, 7—13 (1948). — FELLER, B.: Contribution à l'étude des plaies traitées par un antibiotique dérivé des algues. Thèse vétérinaire, Paris (Alfort) 1948. — HARDER, R., u. H. v. WITSCH: Bericht über Versuche zur Fettsynthese mittels autotropher Mikroorganismen. Forschungsdienst, Organ der deutschen Landwirtschaftswissenschaft, Sonderheft 16, 270 (1941); Über Massenkultur von Diatomeen. Ber. dtsh. Bot. Ges. **60**, 146 (1942). — KLOSA, J.: Ein neues Antibioticum aus Grünalgen. Z. f. Naturforsch. **4b**, 187 (1949). — LACKEY, B. Y.: Two groupes of flagellated Algae serving as indicators of clean water. J. Amer. Water World Assoc. **33**, 1099 (1941). — LEFÈVRE, M.: Technique des cultures cloniques de Desmidiées. Ann. Sc. Nat., Bot. **10**. Sér., **19** (1937). — LEFÈVRE, M., H. JAKOB et M. NISBET: Auto- et hétéroantagonisme chez les Algues d'eau douce in vitro et dans les collections d'eau naturelles. Annales de la Station Centrale d'Hydrobiologie appliquée. **4**, 5—198 (1952). — LESAGE, I.: Phycothérapie et Phycéine. Bull. Acad. Vét. **18**, 272 (1945). — OPPERMANN, A.: Das antibiotische Verhalten einiger holzzersetzender Basidiomyceten zueinander und zu Bakterien. Arch. f. Mikrobiol. **16**, 364 (1951). — PRATT, R.: Influence of the size of the inoculum on the growth of *Chlorella vulgaris* in freshly prepared culture medium. Amer. J. Bot. **27**, 52 (1940); Studies on *Chlorella vulgaris*. V. Some properties of the growth inhibitor formed by *Chlorella* cells. Amer. J. Bot. **29**, 142 (1942). — PRATT, R., T. C. DANIELS, J. J. EILER, J. B. GUNNISON, W. D. KUMMLER, J. F. ONETO, H. A. SPOEHR, G. J. HARDIN, H. W. MILNER, J. H. C. SMITH and H. H. STRAIN: Science **99**, 351 (1944). — PRATT, R., and J. FONG: Studies on *Chlorella vulgaris*. II. Further evidence that *Chlorella* cells form a growth inhibiting substance. Amer. J. Bot. **27**, 431 (1940). — SPOEHR, H. A.: Biochemical investigations. Carnegie Institution, Washington, Year Book **44**, 66 (1945). — SPOEHR, H. A., J. H. C. SMITH, H. H. STRAIN, H. W. MILNER and G. J. HARDIN: Fatty Acid Antibacterials from Plants. Carnegie Inst. of Washington, Publicat. **586**, 1 (1949).

(Aus den Botanischen Anstalten der Martin-Luther-Universität Halle a. d. Saale.)

Zur Kenntnis der Ernährungsphysiologie der Gattung *Pilobolus*.

Von
HORST LYR.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. August 1953.)

Seit 1949 befaßte ich mich auf Anregung von Herrn Prof. BUDER mit dem Studium der Sexualverhältnisse in der Gattung *Pilobolus*. Dabei ergab sich, daß nur *Pilobolus crystallinus* Tode ohne Schwierigkeiten zur Zygotenbildung zu bringen ist, was KRAFCZYK bereits ausführlich beschrieben hat. Bei allen anderen Arten stieß die Untersuchung der Sexualvorgänge auf unerwartete Schwierigkeiten, da selbst bei gutem vegetativen Wachstum anfänglich keine Zygoten gebildet wurden. Sehr bald erwies sich, daß besondere Ernährungsansprüche die Ursache für die mangelhafte Zygotenbildung waren. Vertreter der Gruppe von *P. Kleinii* konnten nur auf ungeklärtem Pferdemitpreßsaft-Agar zur Kopulation gebracht werden, obwohl das Wachstum und die Trägerentwicklung auf geklärtem Agar als gut zu bezeichnen war. Der Bodensatz des Preßsaftes übte eine starke, fördernde Wirkung auf die Zygotenbildung aus. Eine sehr wesentliche Ausweitung des Problems brachte die Beobachtung, daß Bakterien die Zygotenbildung und das Wachstum der *Pilobolus*-Arten anzuregen vermögen. Um die Sexualvorgänge besser verfolgen und sicherer reproduzieren zu können, wurde die Ernährungsphysiologie der *Pilobolus*-Arten eingehender studiert.

Durch vergleichende Betrachtung einer größeren Zahl von Stämmen wurde ich auf einige Formen aufmerksam, die von den bisher beschriebenen *Pilobolus*-Arten abwichen. So gelang es, ein Pärchen zu isolieren, das sich von den sonst sehr ähnlichen *P. Kleinii*-Stämmen in der Art der Zygotenbildung und in anderen Eigenschaften unterschied. Die neue Form wurde als *P. gracilis* Lyr beschrieben. Die Angaben von PALLA über die Formenmannigfaltigkeit der Gruppen von *P. Kleinii* und *P. sphaerosporus* konnten bestätigt werden. Der von KRAFCZYK und anderen Autoren beschriebene *P. crystallinus* wurde *P. crystallinus* Tode subsp. *typicus* Lyr benannt, da noch ein anderer Vertreter von „*P. crystallinus*“ gefunden wurde, der abweichende Merkmale aufwies und sich auch hinsichtlich der Zygotenbildung und Ernährungsphysiologie anders verhielt. Auf Grund ihrer ungleich großen Sporen erhielt diese Form die Bezeichnung *P. crystallinus* Tode subsp. *anisosporus* Lyr (s. LYR 1952, 1953; dort auch weitere Literatur). Für die vergleichenden ernährungsphysiologischen Untersuchungen, deren erste Ergebnisse hier mitgeteilt werden sollen, wurden folgende Arten herangezogen: *P. crystallinus* Tode subsp. *typicus*,

P. crystallinus Tode subsp. *anisosporus*, *P. gracilis* Lyr, *P. Kleinii* v. Tiegh., *P. sphaerosporus* Palla und *P. umbonatus* Buller.

I. Das Wachstum von *Pilobolus* auf verschiedenen Nährböden.

Vertreter der Gattung *Pilobolus* sind als ausgesprochene Ernährungsspezialisten bekannt. Versuche, sie auf synthetischen Nährböden oder auf den sonst üblichen Substraten zu kultivieren, sind bisher stets gescheitert¹. Die umfangreichsten Untersuchungen über die Ernährungsphysiologie einiger *Pilobolus*-Arten stellte bisher BERSA an. Seine Ergebnisse sollen später noch besprochen werden.

Da von Anfang an die Vermutung bestand, daß vor allem der Mangel an besonderen vitaminartigen Substanzen das Wachstum von *Pilobolus* begrenzt, wurde nicht — wie es BERSA hauptsächlich getan hatte — die Wirkung chemisch reiner Substanzen untersucht, sondern es wurden komplexe Nährböden verschiedener Typen herangezogen. Auch BERSA hatte mit komplexen Nährböden seine besten Erfolge erzielt. Neben dem Einfluß der Nährböden auf das Wachstum wurde auch ihre Wirkung auf die Sexualrektion geprüft, wozu mehrere *Pilobolus*-Arten vergleichsweise herangezogen wurden. Besondere Aufmerksamkeit widmete ich Heuextrakten, die bereits mehrfach als wachstumsfördernd für *Pilobolus* beschrieben worden sind (KRAFCZYK, R. SCHNEIDER, LYR).

a) Malz-Pepton-Agar.

Malz-Pepton-Agar, wie ihn KRAFCZYK verwandt hat (4% Malz und 0,5% Pepton), erwies sich als recht günstig für *P. crystallinus* Tode subsp. *typicus* Lyr, der darauf Träger und Zygoten bildet; freilich nicht so üppig wie auf gutem Mistagar. Recht gut wächst darauf auch *Pilobolus umbonatus* Buller mit zahlreichen Trägern und dichtem Mycel, das unter dem Mikroskop aber sparrig aussieht. *P. gracilis* Lyr hingegen zeigt nur schwaches Wachstum, bildet kaum Träger und nie Zygoten. Ebenso verhalten sich die *Kleinii*-Stämme. Für Kopulationsversuche mit letzteren Arten ist dieser Nährboden also unbrauchbar.

Ersetzt man das Pepton durch die gleiche Menge Asparagin, so wird das Wachstum zwar nicht aufgehoben aber verschlechtert. Auch die Träger- und Zygotenbildung von *P. crystallinus* wird eingeschränkt. Es sind aber im Malz noch Stoffe vorhanden, die wenigstens ein mäßiges Mycelwachstum ermöglichen.

b) Möhrensaft.

Verwendet wurde ein Gemisch von Möhrensaft mit etwas Fruchtsaft, das ohne Konservierungsmittel zubereitet im „Reformhaus“ erhältlich war. Mit Agar versetzt, ergab das Gemisch einen guten Nährboden für *Phycomyces* und *Sporodinia*.

¹ Eine Ausnahme machten die Erfahrungen KRAFCZYKS, der für das Wachstum und die Sexualreaktion von *Pilobolus crystallinus* Tode Malz-Pepton-Agar günstig fand.

Die *Pilobolus*-Arten wuchsen darauf nur sehr kümmerlich. Das Mycel war spärlich und sparrig, die Hyphen waren vacuolisiert und mit Öltröpfchen erfüllt. Weder Träger noch Zygoten wurden gebildet.

c) Möhrensaft mit Mistdekokt.

Besseres Wachstum konnte erzielt werden mit einer Mischung von Möhrensaft und geklärtem Pferdemistdekokt zu gleichen Teilen.

Phycomyces entwickelte sich darauf sehr kräftig. *P. crystallinus* wuchs mit sehr dichter, geschlossener Hyphenfront, bildete einen deutlichen Hemmungsraum, mehrere Gametangien und einige wenige Zygoten. Die Hyphen waren auffallend dick und kräftig orangerot. Nach 9 Tagen setzte die Bildung von Gemmen ein; viele Trophocysten wurden zu Gemmen umgebildet. Die Trägerentwicklung war gering.

Auch *P. gracilis* wuchs dicht mit kräftigem Mycel. Die Hyphen waren ebenfalls sehr dick und carotinreich. An mehreren Stellen wuchs das Mycel so dicht, daß es makroskopisch als gelber Filz zu erkennen war. Nach 9 Tagen bildeten sich viele Gemmoidtrophocysten, die sich nicht weiter entwickelten. Trotz des dichten Mycelwachstums erfolgte keinerlei Zygotenbildung.

Möhrensaft vermochte also mit Mistdekokt das Mycelwachstum zu begünstigen, enthielt aber keine Stoffe, die die Zygotenbildung anregten.

d) Pflaumensaft.

45 g entkernte Trockenpflaumen wurden in 100 cm³ dest. Wasser unter Zusatz von 2% Agar sterilisiert. Nach dem Sterilisieren wurde der pH-Wert von 3,5 auf 6,5 eingestellt.

P. crystallinus und *P. gracilis* keimten auf diesem Substrat nicht. *Sporodinia grandis* hingegen wuchs darauf ausgezeichnet und bildete reichlich Zygoten.

e) Reiner „S“-Agar (Grundnährlösung).

Für alle weiteren Versuche mit Extrakten und ähnlichen Zusätzen wurde eine Grundnährlösung von folgender Zusammensetzung verwandt (S-Agar): 3% Glucose; 0,1% Asparagin; 0,05% MgSO₄; 0,1% KH₂PO₄; 0,1% K₂HPO₄; 2% Agar. Diese Zusammenstellung entspricht etwa der, die SCHOPFER 1934 für *Phycomyces* verwandt hatte. Für meine Zwecke wandelte ich sie etwas ab, indem ich statt 10% Glucose nur 3% nahm und durch den Phosphatpuffer den für *Pilobolus* optimalen pH-Wert von 6,5—7 einstellte. Diese Mischung hatte sich bereits bei der Kultur anderer Mucorineen bewährt und ermöglichte bei entsprechenden Vitaminzusätzen ein optimales Wachstum von *Phycomyces*, *Rhizopus*, *Pilaira*, *Chaetocladium*, *Mucor* und *Thamnidium*.

Stickstoff- und Kohlenstoffquellen sind in dem Medium wahrscheinlich supraoptimal vorhanden. *Phycomyces* benötigt z. B. (nach MOSER) einen maximalen Glucosezusatz von 1%.

Es besteht kein Grund zu der Annahme, daß andere Mucorineen in ihren quantitativen Ansprüchen wesentlich verschieden sind. Man kann daher diesen synthetischen Nährboden, der in Zukunft mit dem Buchstaben „S“ abgekürzt werden soll, als völlig ausreichend in Bezug auf die Kohlenstoff- und die Stickstoffmenge bezeichnen.

Auf einem Nährboden dieser Zusammensetzung vermag keine der untersuchten *Pilobolus*-Arten zu wachsen. Manchmal tritt spärliche Keimung ein, die im wesentlichen durch die in den Sporen enthaltenen Nährstoffe und Wachstumsstoffe bedingt ist. Gelegentlich werden an den dünnen Hyphen kleine Trophocysten angelegt, die sich aber nicht weiterentwickeln. Von allen *Pilobolus*-Arten keimt *P. sphaerosporus* am leichtesten. Das Bild ist das gleiche, wenn man *Phycomyces* auf synthetischem Nährboden ohne Vitaminzusatz wachsen läßt. Durch verschiedene Zusätze wurde nun versucht, fehlende Substanzen — seien es Wirkstoffe oder akzessorische Nährstoffe — zu ergänzen.

f) Pfifferlingsdekot.

7 g frische Pfifferlinge wurden in 70 cm³ dest. Wasser aufgeköcht. Es entstand eine klare, gelbliche Flüssigkeit mit dem typischen aromatischen Pfifferlingsgeruch. Diese wurde dekantiert und 20 cm³ Dekot zu 100 cm³ „S“ zugesetzt. *P. crystallinus*, *P. umbonatus* und *P. sphaerosporus* keimten spärlich mit dünnen, zarten Hyphen, die ihr Wachstum bald einstellten. *P. gracilis* war überhaupt nicht gekeimt.

Es war praktisch kein Unterschied gegenüber der Kontrolle mit reinem S-Agar festzustellen.

g) *Phycomyces*-Dekot.

Eine 14 Tage alte *Phycomyces*-Kultur auf synthetischem Nährboden mit Aneurin-Zusatz wurde aufgeköcht und 20 cm³ Dekot zu 100 cm³ „S“ zugefügt.

Das Ergebnis war das gleiche wie im vorigen Versuch. Um sicher zu gehen, daß der Mißerfolg nicht auf einer zu niedrigen Konzentration des zugesetzten Dekotes beruhte, wurde noch folgender Ergänzungsversuch angesetzt:

Eine 21 Tage alte *Phycomyces*-Kultur wurde in der Kulturflüssigkeit aufgeköcht, Mycel und Träger abfiltriert und zum Filtrat die Salze des synthetischen Nährbodens und 2% Agar zugegeben. Nach dem Sterilisieren wurde der Nährboden mit *Pilobolus* beimpft.

Das Ergebnis entsprach etwa dem des vorigen Versuches. Nur *P. sphaerosporus* hatte die Platten dünn durchgewachsen, ohne aber Trophocysten zu bilden. Nur um die Impfstelle war das Mycel dichter. *Chaetocladium* und *Pilaira anomala* durchwucherten dicht die Schalen. *Phycomyces* enthält demnach keine durch einfaches Aufkochen extrahierbaren Substanzen, die auf *Pilobolus* wachstumsfördernd wirken.

h) Algendekot.

Eine Watte von Algen, hauptsächlich aus *Cladophora* und etwas *Spirogyra* bestehend, wurde unter der Wasserleitung abgespült, das anhaftende Wasser durch Ausdrücken entfernt und die Algen 10 min in „S“-Agar aufgeköcht. Die Algenreste wurden über Glaswatte abfiltriert. Der Agar war leicht grünlich gefärbt.

Nach 18 tägiger Kulturdauer ergab sich folgendes Bild: *P. crystallinus* war nicht gekeimt. *P. umbonatus* 2 cm um die Impfstelle licht aus-

gewachsen und *P. gracilis* hatte wenige lange Hyphen und sofort Gemmen gebildet. *P. sphaerosporus* hatte die Platte ganz dünn durchgewachsen, ohne Trophocysten zu bilden. *Chaetocladium*, das auf reinem S nicht wachstumsfähig ist, hatte die Platten relativ dicht überzogen.

i) Leberdekokt.

15 g frische Kaninchenleber wurden in 100 cm³ dest. Wasser 45 min gekocht und 20 cm³ der klaren, gelblichen Brühe zu 100 cm³ „S“-Agar zugesetzt. Der Nährboden wurde 10 min bei 1 atü sterilisiert.

P. umbonatus wuchs mit carotinreichen Hyphen relativ dicht 0,5 cm um die Impfstelle. *P. crystallinus* war nicht gekeimt und *P. sphaerosporus* hatte die Platte spärlich durchgewachsen. *Pilaira* und *Chaetocladium* entwickelten sich hingegen sehr üppig.

k) Hefedekokt.

10 g Bäckerhefe wurden mit 200 cm³ Leitungswasser aufgekocht, filtriert und 1 cm³ vom Filtrat zu 100 cm³ S zugesetzt. Der Nährboden wurde darauf im Autoklaven sterilisiert.

P. crystallinus keimte spärlich mit vacuolisierten Hyphen; ebenso *P. gracilis*, der sofort Gemmen bildete. Die gleiche Wirkung hatte ein Zusatz von 20 cm³ Hefedekokt.

l) Hefeextrakt.

Um die wasserlöslichen Extraktivstoffe der Hefe noch weiter zu konzentrieren, wurden 50 g Bäckerhefe mit 200 cm³ 70% igem Alkohol 7 Tage bei Zimmertemperatur in einem verschlossenen Kolben stehengelassen. Darauf wurde der Alkohol dekantiert und im Vakuum abdestilliert. 100 cm³ S wurden mit 20 cm³ des nunmehr wäßrigen Extraktes versetzt.

Nach 20 tägiger Kulturdauer waren *P. umbonatus* und *P. gracilis* nicht oder nur mit wenigen Hyphen gekeimt. *P. sphaerosporus* war spärlich bis zu 2 cm ausgewachsen und hatte zahlreiche Gemmen gebildet. Demnach enthalten Hefedekokte oder alkoholische Hefeextrakte keine Stoffe, die auf *Pilobolus* wachstumsfördernd wirken.

m) Extrakte von angekeimtem Weizen.

30 g Weizenkörner wurden mit 0,1% iger Sublimatlösung keimfrei gemacht, sorgfältig gewaschen und in feuchten Schalen 48 Std ankeimen gelassen. Danach wurden sie mit 200 cm³ 70% igem Alkohol in der oben beschriebenen Weise kalt extrahiert. Ebenso wurde in Parallelversuchen mit Weizenkörnern verfahren, die noch im trockenen Zustand im Mörser zerrieben wurden.

Ferner wurde gekeimter Weizen, der im Licht aufgewachsen war und bei dem die Primärblätter gerade die Koeptilen durchbrochen hatten, extrahiert; ebenso ein Weizen gleichen Alters, der im Dunkeln angezogen worden war.

Ein Zusatz von 20 cm³ der aus obigen Materialien gewonnenen wäßrigen Extrakte zu 100 cm³ S bewirkte nur spärliches Wachstum von *P. crystallinus*, *P. umbonatus* und *P. gracilis*.

Unterschiedliche Wirkungen der einzelnen Extrakte konnten nicht mit Sicherheit festgestellt werden.

n) *Pferdeharn*.

Frischer Pferdeharn wurde zu gleichen Teilen mit dest. Wasser verdünnt und darin die Salze von „S“ aufgelöst. Nach 20tägiger Kultur waren weder *P. crystallinus* noch *P. gracilis* gekeimt. An einigen Stellen wurde die Abscheidung von Kristallen im Agar beobachtet. Jedoch ist nicht anzunehmen, daß eine zu hohe Salzkonzentration der Grund für das negative Ergebnis war. Vermutlich handelte es sich um Carbonate, die im Harn von Pflanzenfressern in größerer Menge anzutreffen sind.

Durch das von mir angewandte Verfahren wurden nur die wasserlöslichen bzw. alkohollöslichen extrahierbaren Stoffe erfaßt. Es läßt sich daher noch nicht sagen, ob die untersuchten Materialien überhaupt keine fördernden Substanzen enthalten, denn solche können möglicherweise in gebundener Form vorliegen und sich erst nach fermentativem Abbau extrahieren lassen.

Immerhin ist die völlige Unwirksamkeit von Hefe- und Leberdekokt, die eine Fülle der verschiedensten Nähr- und Wirkstoffe enthalten, sehr auffällig. Es bestätigt sich damit der Eindruck, den frühere Beobachter bereits gewonnen haben, daß *Pilobolus* ein ausgesprochener Ernährungsspezialist ist.

o) *Die Wirkung von Heuextrakten*.

Weitere Versuche in dieser Richtung hatten vor allem die Feststellung der Wirksamkeit von Heuextrakten zum Ziel. Bereits KRAFCZYK hatte auf die günstige Wirkung von Heudekokten hingewiesen. SCHNEIDER und STOLL beobachteten, daß der Mist von Tieren, die wenig Grünfutter erhalten hatten, für die *Pilobolus*-Kultur schlecht geeignet war. Auch BERSA erzielte seine besten Erfolge mit Weizenstrohextrakten. Zunächst galt es, diese Befunde zu bestätigen.

Orientierende Versuche zeigten, daß Dekokte von Roggenstroh mittleres bis mäßiges Mycelwachstum von *P. gracilis* und *P. Kleinii* ermöglichten. *P. crystallinus*, *P. umbonatus* und *P. sphaerosporus* wuchsen besser, ohne aber sehr üppig zu fruktifizieren.

In späteren Versuchen wurde hauptsächlich mit Heudekokten und Heuextrakten gearbeitet.

Wie einige orientierende Versuche ergaben, ist die Verdünnung des Nährbodens (Pferdemistpreßsaft) nicht ohne Einfluß auf das Wachstum der einzelnen Arten. *P. longipes* und *P. Kleinii* stellen die höchsten Ansprüche an die Konzentration des Substrates. Wesentlich anspruchsloser sind *P. umbonatus* und *P. crystallinus* subsp. *typicus*. Dadurch läßt sich vielleicht das unterschiedliche Vorkommen der einzelnen Arten auf Stallmist bzw. Mist von Wild- oder Weidetieren erklären. Letzterer ist durch

Tabelle 1. Wirkung verschiedener Zusätze zu geklärtem Preßsaff-Agar auf das Wachstum und die Zygotenbildung von *P. crystallinus* und *P. gracilis*.

		Pr	Pr + 0,5% Pepton	PrH	PrH + 0,5% Pepton	PrH + 0,5% Pepton + 3% Zucker	PrH + 1% Pepton
1.	<i>P. cryst.</i> subsp. <i>typicus</i>	Wachstum: Zygoten: 1 Zygote	+++ keine Zygoten	+++ mehrere Zygoten	+++ zahlreiche Zygoten	+++ sehr zahlr. Zygoten, deutliche Linie erkennbar	+++ bis +++ sehr viele Zygoten, dichte Linie
2.	<i>P. gracilis</i>	Wachstum: Zygoten:	+++ keine Zygoten	+++ einige Zygoten	+++ Kopulationen nur ansatz- weise	+++ keine reifen Zygoten	+++ bis +++ viele Zygoten
Wachstum von <i>P. crystallinus</i> und <i>P. gracilis</i> wie in den beiden oberen Spalten.							
3.	<i>P. crystallinus</i> × <i>P. gracilis</i>	keine Kop.	keine Kop.	mehrere Knäuel und Gametangien	viele Kop.	zahlreiche Kop.	sehr viele Kopulationen

Zeichenerklärung: + geringes, ++ mäßiges, +++ mittleres, ++++ gutes, +++++ sehr gutes Mycelwachstum. (Diese Bezeichnungsweise ist auch in den folgenden Protokollen beibehalten.)

Regen und Tau starken Auswaschungen unterworfen, was man im Freien häufig beobachten kann. Es werden sich darauf bevorzugt Arten entwickeln, die keine so hohen Ansprüche an die Konzentration des Substrates stellen.

In einer Versuchsreihe wurde die Wirkung verschiedener Zusätze zu geklärtem Mistpreßsaft¹-Agar untersucht. Als Zusätze benutzte ich Heudekokt, Pepton und Rohrzucker. Diese drei Substanzen hat KRAFCZYK als besonders zygotenfördernd für *P. crystallinus* beschrieben. Geprüft wurde ihre Wirkung auf *P. crystallinus* subsp. *typicus*, *P. gracilis* und auf die Bastardreaktion zwischen *P. crystallinus* und *P. gracilis*.

Aus Tab. 1 geht hervor, daß Wachstum und Zygotenbildung von *P. crystallinus* in allen Fällen besser sind als von *P. gracilis*. Ein Zusatz von Heudekokt verbessert stets das Mycelwachstum und die Zygotenbildung. Pepton wirkt besonders zusammen mit Heudekokt fördernd. Ein Zusatz von 3% Rohrzucker ist günstig für die Zygotenbildung von *P. crystallinus*, hat aber auf *P. gracilis* keine sonderliche Wirkung. Damit sind die Ergebnisse von KRAFCZYK für *P. crystallinus* bestätigt. Gleichzeitig zeigt sich aber, daß sie nicht ohne weiteres auf *P. gracilis* übertragbar sind.

Die Bastardreaktion wies deutlich den intermediären Charakter auch in der Intensität der Reaktion auf. Diese war stärker als die von *P. gracilis*, aber schwächer als die von *P. crystallinus*. Der Preßsaft, der zu diesem Versuch verwendet wurde, war offenbar nicht besonders gut, so daß *P. gracilis* körnige und sparrige Hyphen bildete, während *P. crystallinus* kaum beeinflußt wurde. Es traten dadurch die Unterschiede zwischen den beiden Arten besonders deutlich zu Tage.

Noch klarer wird das vorhin geschilderte Ergebnis in einer Versuchsreihe, in der die Wirkung von Heudekokten ohne Preßsaft geprüft wurde (Tab. 2):

Tabelle 2. Die Wirkung von Rohrzucker und Pepton als Zusatz zu Heudekokt auf die Zygotenbildung von *P. crystallinus* und *P. gracilis*.

	Heudekokt	Heu + 3% Zucker	Heu + 3% Zucker + 0,5% Pepton
<i>P. crystallinus</i>	+ bis ++ keine Kopulation	++ keine Kopulation	+++ zahlr. Kopulationen gut sichtbare Zygotenlinie
<i>P. gracilis</i>	+ keine Kopulation keine Träger	nicht gekeimt	++ keine Kopulation einige Träger
<i>P. crystallinus</i> × <i>P. gracilis</i>	keine Kopulation	keine Kopulation	mehrere Kopulationen

¹ Im Folgenden stets als Pr bezeichnet. PrH bedeutet Mistpreßsaft mit Zusatz von Heudekokt.

Besonders Pepton übt also eine günstige Wirkung aus, die für *P. crystallinus* nicht aber für *P. gracilis* ausreicht, um zahlreiche Zygoten zur Reife kommen zu lassen. Zusatz von Rohrzucker allein ist unter diesen Versuchsbedingungen für *P. gracilis* wie für *P. crystallinus* in gleicher Weise unwirksam. Offenbar ist er als Kohlenhydrat nicht der das Wachstum begrenzende Minimalfaktor.

„S“ + Pepton.

Um die Wirkung des Peptons allein zu prüfen, wurde zu dem synthetischen Grundnährboden „S“ 1% Pepton zugegeben. Gegenüber der Kontrolle mit „S“ allein war eine Verbesserung des Wachstums feststellbar. *P. crystallinus* durchzog mit dünnem Mycel die Platte und bildete einige Träger. *P. gracilis* und ein *P. Kleinii*-Stamm erzeugten nur Gemmen und Gemmoidtrophocysten. Zygoten wurden nicht gefunden. Ein Zusatz von Pepton allein vermag also nicht, eine einigermaßen normale Entwicklung auszulösen.

In der Absicht, den üblichen klaren PrH für Kopulationsversuche brauchbarer zu machen, setzte ich 3% Pepton hinzu. Das Ergebnis war zwar ein sehr dichtes Mycelwachstum, aber keinerlei Träger oder Zygotenbildung bei *P. Kleinii*. Sehr auffallend war dabei, daß etwa nach 20 Tagen angelegte Trophocysten und Gemmen mit enorm dichtem Mycel auszukeimen begannen, das in sehr dichter Front ganz langsam weiterwuchs. Makroskopisch machten diese Stellen den Eindruck von *Penicillium*-Mycelien. Später wurden auch noch einige Träger gebildet.

Pepton scheint demnach nicht geeignet zu sein, die Zygotenbildung in der *Kleinii*-Gruppe zu fördern. Seine Wirkung beschränkt sich offenbar mehr auf die Förderung des Mycelwachstums.

„S“ + Heudekokt.

Zusatz von Heudekokt zu „S“ ermöglicht ein geringes Wachstum, dessen Intensität von der zugesetzten Menge des Dekoktes abhängig ist. Die gleiche Wirkung besitzt eine Abkochung von frischem Gras. Es müssen also fördernde Substanzen auch im Gras vorhanden sein.

Das steht in einem gewissen Widerspruch zu den Befunden von SCHNEIDER, die durch Zerreiben von frischem Gras und Zusatz eines wäßrigen Extraktes davon zu Pferdemit keine Förderung des Wachstums von *P. Kleinii* feststellen konnte. Wahrscheinlich dürften methodische Unterschiede die Ursache für die abweichenden Ergebnisse sein.

Nachdem durch diese Vorversuche die fördernde Wirkung von Heudekokten eindeutig klargestellt war, konnte daran gedacht werden, die im Dekokt in sehr verdünnter Form enthaltenen Stoffe irgendwie anzureichern. Zu diesem Zwecke bediente ich mich der Extraktion von Heu mit 70% igem Alkohol.

Der erste Versuch in dieser Richtung war ein Fehlschlag. Ich hatte folgendes Verfahren angewandt: Zerkleinertes Heu wurde mit 70%igem Alkohol 2 Std auf 70° C erhitzt, die gelbgrün-braune Flüssigkeit abfiltriert und der Alkohol im Wasserbad abdestilliert, was etwa 4 Std dauerte. Der wäßrige Rückstand war eine rot-braune, trübe Flüssigkeit, die einen flockigen Niederschlag enthielt. Letzterer wurde abfiltriert. Eine synthetische Nährlösung zur Hälfte mit diesem Heukonzentrat versetzt, ermöglichte keinerlei Wachstum. *P. gracilis* keimte nicht einmal. Inwieweit die Erhitzung der alkoholischen Lösung eine Minderung der Aktivität mit sich bringt, konnte durch spätere Versuche nicht eindeutig kargestellt werden.

In diesem Zusammenhang ist eine andere Beobachtung beachtenswert. Bei einer Extraktion von altem Heu, das sicher schon über $\frac{1}{2}$ Jahr oder länger gelagert hatte, erhielt ich nicht wie sonst üblich eine grüne, sondern eine braune alkoholische Lösung. (Die Extraktion erfolgte auf kaltem Wege nach dem anschließend zu beschreibenden Verfahren.) Das Wachstum auf einem solchen Heuextrakt war gegenüber einem, der von frischem Heu hergestellt worden war, sehr schlecht und die Trägerbildung gering. Es scheint demnach während der Lagerung des Heus ein Verlust an aktiven Substanzen einzutreten. Eine ähnliche Beobachtung machte BERSA an seinen selbsthergestellten Xylanpräparaten.

Ob der oben beschriebene Mißerfolg auf der Verwendung von zu altem Heu beruhte, kann leider nicht mehr festgestellt werden.

Für spätere Versuche wurde folgendes Extraktionsverfahren angewendet:

20 g lufttrockenes Heu werden in einem Kolben mit 500 cm³ 70%igem Äthylalkohol eine Woche bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Danach wird die intensiv grün gefärbte Lösung abfiltriert und der Alkohol im Vakuum abgedampft. Die Lösung wird dabei nicht über 40° erwärmt. Der wäßrige Rückstand ist grünlich gefärbt, enthält einen trüben, flockigen Niederschlag und ist nunmehr gegen Kochen und Erhitzen im Autoklaven stabil. Die wäßrige Lösung soll in Zukunft kurz als „HE“ (Heuextrakt) bezeichnet werden. Ihre Herstellung ist in allen Versuchen die gleiche.

Nachdem Vorversuche die Brauchbarkeit dieses Extraktes erwiesen hatten, wurde in einer Versuchsreihe die Wirkung von HE auf das Wachstum und die Zygotenbildung folgender *Pilobolus*-Arten geprüft: *P. crystallinus* Tode subsp. *typicus* Lyr, *P. gracilis* Lyr, *P. Kleinii* v. Tiegh. (Stämme VI und XIV₁), *P. sphaerosporus* Palla, *P. umbonatus* Buller und *P. crystallinus* Tode subsp. *anisosporus* Lyr. Die beiden letztgenannten Arten können in Tab. 3 zusammengefaßt werden, da sie sich grundsätzlich gleich verhielten. Zugleich wurde die Menge des zugesetzten HE variiert, um die Wirkung von steigenden HE-Konzentrationen festzustellen.

Als Grundnährboden wurde der übliche synthetische Agar (S) verwandt. Trockengewichtsbestimmungen von verschiedenen Heuextrakten ergaben ein durchschnittliches Gewicht an Trockensubstanz von 0,3 g je 10 cm³ Heuextrakt. Dieser Mittelwert ist bei den Angaben in der Tabelle zugrunde gelegt.

Aus Tab. 3 lassen sich mehrere bemerkenswerte Einzelheiten herauslesen. Steigende Zusätze von HE bewirken eine deutliche Verbesserung des Mycelwachstums bei allen Arten. Damit parallel geht eine Steigerung

Tabelle 3. Die Wirkung von Heuextrakt in verschiedenen Konzentrationen auf das Wachstum einiger *Pilobolus*-Arten.

HE-Zusatz zu 100 cm ³ S (Trockengew.)	<i>P. crystallinus</i>	<i>P. gracilis</i>	<i>P. Kleintii</i> VI und XIV ₁	<i>P. sphaerosporus</i>	<i>P. umbonatus</i> und <i>anisosporus</i>
0 cm ³ (0 g)	0 bis + 5 keine Zygoten	0 bis + 1 1—2 cm Mycel im Ø um Impfstelle	0 0 kaum gewachsen	+ 19	0 bis + 0
0,5 cm ³ (0,015 g)	+ 14 kaum Zygoten	+ 16 keine Zygoten	+ 16 keine Zygoten	+ 31	++ 0
1 cm ³ (0,03 g)	++ 30 mehrere Zygoten	+ 20 keine Zygoten	++ 22 keine Zygoten	++ 55	+++ 1
2 cm ³ (0,06 g)	+++ 42 erkennbare Zygotenlinie	+++ 65 keine Zygoten	++ 34 keine Zygoten	++ bis +++ 58	+++ bis ++++ 0
4 cm ³ (0,12 g)	+++ bis ++++ 32 schwache Zygotenlinie	+++ 118 keine Zygoten	+++ 49 keine Zygoten	+++ 61	++++ 3 Zonierung
8 cm ³ (0,24 g)	++++ 180 deutliche Zygotenlinie	++++ 110 3 Zygoten	++++ 38 keine Zygoten	++++ 161	++++ 0 deutliche Zonierung
16 cm ³ (0,48 g)	++++ 79 kräftige Zygotenlinie	++++ bis ++++++ 223 keine Zygoten	++++ 70 keine Zygoten	++++ 221	++++ 0 sehr deutliche Zonierung
32 cm ³ (0,96 g)	+ i + + + + 18 Mycel- durchmesser 4 cm	+ + + + + + 27 Mycel- durchmesser 3,5 cm	nicht gekeimt	+ + + + + + 0 Mycel- durchmesser 5 cm	+ + + + + + 0 Mycel- durchmesser 4,5 cm

Zeichenerklärung: 0 = kein Wachstum, 0 bis + = ganz spärliches Wachstum, + = schwaches Wachstum, ++ = mäßiges Wachstum, +++ = mittleres Wachstum, ++++ = gutes Wachstum, +++++ = sehr gutes Mycelwachstum. — Die Zahlen bedeuten abgeschossene Sporangien. Versuchsdauer 18 Tage. — Das subjektive Verfahren zur Messung des Mycelwachstums mußte angewandt werden, da die *Pilobolus*-Arten in Flüssigkeitskulturen nur so spärlich Mycel bilden, daß Myceltrockengewichtsbestimmungen mit der nötigen Genauigkeit kaum durchgeführt werden können.

der Sporangienproduktion. (Von *P. umbonatus* und *anisosporus* sei zunächst abgesehen.) Die Zahl der Träger erreichte bei *P. crystallinus* subsp. *typicus* mit einem HE-Zusatz von 8 cm³ und bei *P. gracilis*, *P. Kleinii* und *P. sphaerosporus* mit 16 cm³ ihren Höchstwert. Eine weitere Verdoppelung des HE-Zusatzes bewirkte bei allen Arten eine charakteristische Veränderung des Wachstums. Die Dichte des Mycel nahm weiterhin stark zu, so daß enorm dichte Mycelareale entstanden, die fast an die Wuchsform von *Penicillium* erinnerten. Die Hyphen lagen eng nebeneinander und waren relativ dünn. Zugleich war die Wachstumsgeschwindigkeit sehr verringert, so daß die Mycelien bei einem HE-Zusatz von 32 cm³ nach 18 Tagen den Rand der PETRI-Schalen nicht erreicht hatten, sondern Areale von den in der Tabelle angegebenen Durchmesser bildeten. Gleichzeitig war die Bildung von Trägern stark eingeschränkt.

Es läßt sich daraus erkennen, daß ein Zusatz von HE über ein bestimmtes Maß hinaus die fördernde Wirkung verliert und eine eigentümliche Hemmung des Gesamtwachstums bewirkt.

Ferner ist aus Tab. 3 zu ersehen, daß nur *P. crystallinus* subsp. *typicus* auf diesem Nährboden ziemlich reichlich Zygoten bildet, während *P. gracilis* nur in einem Falle drei kleine Zygoten hervorbrachte und die beiden *Kleinii*-Stämme VI und XIV₁ überhaupt nicht sexuell reagierten. Heuextrakt wirkt demnach nicht unmittelbar fördernd auf die Zygotenbildung der *Kleinii*-Gruppe.

Völlig abweichend in ihrem Wachstumsmodus verhalten sich *P. umbonatus* und *P. crystallinus* subsp. *anisosporus*. Diese erzeugten bei allen HE-Konzentrationen praktisch keinerlei Sporangienträger, sofern die Kultur völlig bakterienfrei war. Unter dem Mikroskop betrachtet, sah ihr Mycel sparrig aus und war von vielen kleinen hellgelben Öltröpfchen erfüllt, was dem Mycel makroskopisch eine gelbe Farbe verlieh. Ferner trat eine charakteristische Wachstumsweise auf, die sich bei höheren HE-Konzentrationen immer stärker ausprägte. Es traten konzentrische Kreise um die Impfstelle herum auf. Diese Erscheinung wurde bereits bei der Kultur anderer Mucorineen beobachtet (vgl. KEHL) und ist wohl in diesem Falle als die Reaktion des Pilzes auf ein ungünstiges Substrat anzusehen. Gelegentlich wurden diese Kreise von einem Kranze von Trophocysten gebildet, die aber nie — wenigstens nicht innerhalb eines Monats — zu Trägern auskeimten.

Zieht man *P. umbonatus* in Flüssigkeitskulturen unter Verwendung von S + 4% HE als Nährboden, so beobachtet man prinzipiell die gleiche Erscheinung wie auf Agar-Platten. Das Mycel wird in der Flüssigkeitskultur etwas dichter, dafür erreicht es meist nur einen Durchmesser von 2—3 cm. Die Hyphen sind sehr carotinreich. Innerhalb eines Monats werden keinerlei Träger gebildet. Erst nach längerem Aufbewahren setzt plötzlich eine starke Trophocystenbildung ein und fast den ganzen folgenden Monat hindurch werden täglich mehrere Dutzend Sporangien abgeschossen, so daß am Ende der Vegetation über 1000 abgeschossene Sporangien an

den Glaswänden haften. Eine experimentell gestützte Erklärung dieses Phänomens ist vorläufig noch nicht möglich; daher will ich nicht näher darauf eingehen.

Eine weitere Beobachtung an Heuextrakt-Kulturen soll noch mitgeteilt werden. In dem Agar, dem eine gewisse Menge HE zugesetzt worden ist, sind regelmäßig kleine Flocken von intensiv dunkelgrüner Farbe zu finden. Offenbar handelt es sich um einen lipoidartigen Körper, der beim Abdampfen des Alkohols als Niederschlag ausgefallen ist. Von diesen Flocken geht eine starke Förderung des Mycelwachstums von *Pilobolus* aus (Abb. 1). In der Nähe befindliche Hyphen geben ihre ursprüngliche Wachstumsrichtung auf und suchen auf dem kürzesten Wege in die Flocke hineinzuwachsen. Nach einiger Zeit verzweigen sich

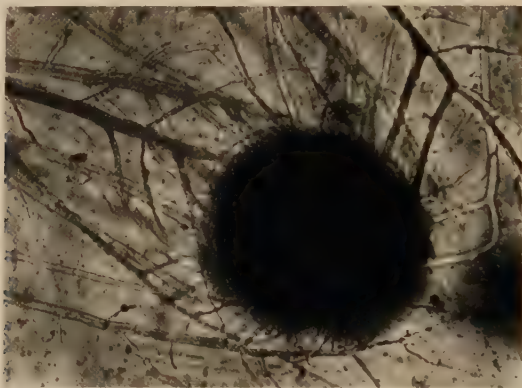


Abb. 1. Chemotropische Anziehung der Hyphen von *P. crystallinus* subsp. *typicus* durch einen Tropfen des lipoiden Niederschlages im Heuextrakt.

die Hyphen darin sehr üppig und bilden in der Umgebung ein dichtes Mycel. Sehr häufig werden in der Nähe des Niederschlages zahlreiche Trophocysten und Träger gebildet. Die Zygotenbildung wird nicht gefördert. Wie spätere Versuche ergaben, dürfte jedoch nicht den lipoiden Substanzen selbst die Wachstumsförderung zuzuschreiben sein. Eventuell ist an Abbauprodukte des Chlorophylls zu denken.

„S“ + HE + Hefeextrakt.

Um zu prüfen, ob dem vorhin beschriebenen Hefeextrakt eine zusätzliche Wirkung auf das Wachstum oder die Zygotenbildung zukommt, wurden zu 100 cm³ S + 8 cm³ HE noch 20 cm³ Hefeextrakt zugesetzt. Es konnte aber kein Unterschied gegenüber den Kontrollen beobachtet werden.

Es ist noch fraglich, ob die Kohlenhydrat- und Stickstoffquellen der synthetischen Grundnährlösung „S“ überhaupt ausgenutzt wurden. Ein Zusatz von 8% HE ermöglichte *P. crystallinus* ein fast ebenso gutes

Mycelwachstum mit „S“ wie ohne Beigabe von „S“. Das ist verständlich, da der Heuextrakt in seiner ungereinigten Form sicher noch verschiedene Nährstoffe enthält. Eine Wachstumssteigerung mit „S“ ist nur zu erwarten, wenn die durch die synthetische Nährlösung gebotenen Nährstoffe den begrenzenden Faktor darstellen würden. Das ist offenbar nicht der Fall. Vielmehr scheinen es die im HE enthaltenen Wirkstoffe zu sein, die die Intensität des Wachstums bestimmen.

II. Die Wirkung verschiedener Vitamine auf das Wachstum und die Zygotenbildung einiger *Pilobolus*-Arten.

Da es sich als sehr wahrscheinlich erwiesen hat, daß nicht Nährstoffe, sondern vitaminartige Körper für das Wachstum von *Pilobolus* von entscheidender Bedeutung sind, lag es nahe, die Wirkung von synthetisch dargestellten Vitaminen zu untersuchen¹.

Für die Untersuchungen wurden Flüssigkeitskulturen benutzt. Als Grundnährmedium diente wiederum „S“. Versuchsdauer 14 Tage. Als Versuchsobjekte wurden *P. crystallinus*, *P. umbonatus* und daneben *Pilaira anomala* und *Chaetocladium Brefeldi* verwandt. Das Ergebnis ist aus Tab. 4 ersichtlich.

Das für die *Pilobolus*-Arten völlig negative Ergebnis machte es überflüssig, die Vitamine noch in anderen Konzentrationen zu untersuchen.

Tabelle 4. Wirkung verschiedener Vitamine auf *P. crystallinus*, *P. umbonatus*, *Pilaira anomala* und *Chaetocladium Brefeldi*.

S +	<i>Pilaira</i>	<i>Chaetocladium</i>	<i>P. crystallinus</i>	<i>P. umbonatus</i>
8 γ /cm ³ Inosit.	0	0	0	0
4 γ /cm ³ p-Aminobenzoesäure	+	0	0	0
4 γ /cm ³ Nicotinsäureamid	+	0 bis +	0	0
4 γ /cm ³ B ₆ (Pyridoxin) .	+	0 bis +	0	0
4 γ /cm ³ Pantothensäure	+	0 bis +	0	0
4 γ /cm ³ B ₁ (Thiamin) .	++++	++ bis +++	0	0
alle Vitamine zusammen in obiger Konzentration	++++	+++	0	0

Die Zusätze von 4 γ je Kubikzentimeter waren schon so reichlich bemessen, daß sich bei einer eventuellen Wirksamkeit ein Wachstumseffekt hätte zeigen müssen. Nur Vitamin B₁ wurde noch eingehender geprüft und in verschiedenen Konzentrationen zu geklärtem Preßsaft zugesetzt.

¹ Dies wurde ermöglicht durch das freundliche Entgegenkommen von Herrn Professor MOTHES, der mir einige der wichtigsten Vitamine in reiner Form zur Verfügung stellte. Ich möchte an dieser Stelle Herrn Professor MOTHES vielmals dafür danken.

Es zeigte sich aber keinerlei Einfluß auf das Wachstum und die Zygotenbildung von *P. crystallinus* und *P. gracilis*. Ebenso unwirksam war das Vitamin K, das in Form des wasserlöslichen Präparates „Hemodal“ verwandt wurde. In Konzentrationen von 0,1—35 γ je Kubikzentimeter übte es keinerlei fördernde Wirkung aus. Orientierende Versuche mit Ascorbinsäure ergaben ebenfalls keine Verbesserung des Wachstums.

Wenn auch die geprüften Vitamine allein völlig wirkungslos auf *Pilobolus* waren, so war es immerhin denkbar, daß sie gegebenenfalls zusammen mit anderen, unbekannten Stoffen fördernd auf das Wachstum oder die Zygotenbildung von *Pilobolus* einwirkten. Um diese Frage zu entscheiden, wurden zu 100 cm³ „S“ mit 8 cm³ HE alle vorhandenen Vitamine in der oben angegebenen Konzentration zugesetzt. Nach 20tägiger Kulturdauer konnten bei *P. crystallinus*, *P. gracilis* und *P. umbonatus* keinerlei Unterschiede gegenüber der Kontrolle (100 cm³ „S“ + 8 cm³ HE) festgestellt werden.

Thiamin, Pyridoxin, Inosit, para-Aminobenzoessäure, Pantothensäure, Nicotinsäureamid und Vitamin K üben also keinen fördernden Einfluß auf das Wachstum der untersuchten *Pilobolus*-Arten aus. Auch kommt ihnen keine akzessorische Wirkung auf einem HE-Nährboden zu. Irgendeine Vermehrung der Zygotenbildung konnte nicht beobachtet werden. Die Trägerbildung von *P. umbonatus* und *P. crystallinus* subsp. *anisosporus* auf HE wird nicht gefördert.

III. Bestimmung einiger Eigenschaften der unbekannten Substanzen.

Von allen untersuchten Naturstoffen hatten sich nur Heuextrakte und Mistpreßsaft als günstig für das Wachstum von *Pilobolus* erwiesen. Um einige Aussagen über die Natur der von *Pilobolus* benötigten Substanzen machen zu können, war es notwendig, ihre wichtigsten Eigenschaften festzulegen. Da es sich bei *Pilobolus* offenbar nicht nur um einen, sondern um mehrere Wirkstoffe handelt, können auf diese Weise vorerst nur die Gesamteigenschaften dieser Stoffe erfaßt werden. Eine Trennung der einzelnen Komponenten wurde noch nicht versucht.

Hitzebeständigkeit.

Auf jeden Fall müssen alle von *Pilobolus* benötigten Substanzen hitzebeständig sein; wobei ich unter „hitzebeständig“ ein Ertragen von Temperaturen bis etwa 130° C verstehe. Die Nährböden überstanden solche Temperaturen beim Sterilisieren im Autoklaven ohne Einbuße ihrer Aktivität. Allerdings waren sie einer derartigen Hitze gewöhnlich nicht länger als 20 min ausgesetzt. Ob bei höheren Temperaturen oder bei längerem Erhitzen im Autoklaven eine Zerstörung der Substanzen eintritt, wurde bisher nicht untersucht.

Veraschung von HE.

Ehe weitere Versuche unternommen wurden, mußte klargestellt werden, ob es sich bei *Pilobolus* um Wirkstoffe organischer oder anorganischer Natur handelt.

Wenn auch letzteres von vornherein nicht sehr wahrscheinlich war, mußte es doch einmal geprüft werden, zumal sich für mehrere Pilze eine Spurenelementwirkung hat nachweisen lassen. HE wurde in einem Porzellantiegel verascht, der Rückstand mit etwas verdünnter Salzsäure aufgenommen und nach dem Neutralisieren zu „S“ zugefügt. Bei allen Arten war das Wachstum nicht besser als in den Kontrollen auf reinem „S“.

Die fördernde Wirkung von HE war durch die Veraschung zerstört worden.

Löslichkeitsverhältnisse.

Aus den Versuchen mit Heudekokten und Heuextrakten ging bereits hervor, daß die fraglichen Substanzen — oder wenigstens ein Teil von ihnen — wasserlöslich und löslich in 70%igem Alkohol sein müssen. Durch die eigentümliche Aktivität der lipoidartigen Flocken im Heuextrakt war es nötig zu prüfen, ob nicht doch noch fettlösliche Faktoren eine Rolle spielen.

Zu diesem Zweck wurde trockenes Heu mit Petroläther extrahiert, der Extrakt etwas eingedampft. Der von dem Lösungsmittel befreite, fettige Rückstand wurde zu einem Gemisch von „S“ und Heudekokt zugegeben. Dadurch konnte aber keine Förderung des Wachstums von *Pilobolus* erzielt werden. Auch eine Kombination der fett- und wasser- bzw. alkohollöslichen Extraktivstoffe des Heus ließ keine Wirkung des fettlöslichen Anteils erkennen. Das mit Petroläther behandelte Heu wurde anschließend mit Wasser ausgekocht und hatte die gleiche fördernde Wirkung wie unbehandeltes.

Somit dürfte feststehen, daß die fettlöslichen Extraktivstoffe des Heus ohne Bedeutung für das Wachstum von *Pilobolus* sind. Die Förderung durch die lipoiden Tröpfchen im Heuextrakt ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, daß beim Ausfallen dieser Flocken aktive Substanzen adsorbiert und mitgerissen wurden. Vermutlich besitzen die aktiven Substanzen des Heuextraktes lipophile Gruppen, die eine solche Adsorption begünstigen.

Da im Pferdemistpreßsaft noch weitere Stoffe vorkommen, die im Heu nicht enthalten sind, mußten auch sie auf Fettlöslichkeit geprüft werden. Zu diesem Zwecke wurde der Bodensatz eines Preßsaftes vorsichtig eingedampft und anschließend mit Petroläther behandelt. Die Lipoidfraktion wurde zu „S“ mit etwas Heudekokt zugesetzt. Sie zeigte keine Wirkung auf *P. crystallinus*, *P. gracilis* und *P. umbo-natus*.

Es ist daher anzunehmen, daß alle von den untersuchten *Pilobolus*-Arten benötigten Stoffe wasserlöslich sind.

Einwirkung von Säuren und Laugen.

Vorversuche ergaben, daß ein kürzeres Aufkochen von PrH¹, der mit HCl auf pH 1 oder mit NaOH auf pH 12 gebracht worden war, keine irreversible Veränderung der Wirkstoffe zur Folge hatte. Für die Kultur war ebenso wie in den folgenden Versuchen jeweils der optimale pH-Wert der nach KRAFCZYK bei 6,5—7 liegt, wieder eingestellt worden. Anders wurden die Ergebnisse, wenn man PrH mit so viel Salzsäure oder Natronlauge versetzte, daß eine 0,06 normale Lösung entstand und diese 5 min bei 1 atü im Autoklaven erhitzte. *P. crystallinus*, *P. sphaerosporus* und *P. umbonatus* keimten nur mit ganz kurzen Hyphen, die ihr Wachstum sofort einstellten. Der Nährboden war durch diese Behandlung für die *Pilobolus*-Kultur unbrauchbar geworden. Es ist anzunehmen, daß die für *Pilobolus* wichtigen Stoffe (oder einer von ihnen) durch Hydrolyse zerstört wurden.

Um zu prüfen, ob nicht durch die Behandlung irgendwelche hemmenden Stoffe entstanden seien, wurden einige Platten mit *Pilaira* und *Chaetocladium* beimpft. *Pilaira anomala* wuchs sowohl auf PrH (Lauge) als auch auf PrH (Säure) sehr gut und bildete viele Träger. Auch *Chaetocladium* wuchs gut an, durchwucherte aber die Platten nur zu zwei Dritteln. Besonders dicht war das Wachstum um die Impfstelle.

Dabei machte ich eine interessante Beobachtung. *Chaetocladium Brefeldi* war auf einige Platten geimpft worden, auf denen vorher *Pilobolus* nicht angewachsen war. Nach drei Wochen war das Luftmycel zusammengefallen und vielleicht schon abgestorben. Dafür begann *Pilobolus* plötzlich auszuwachsen. *P. crystallinus* bildete noch 50 Träger. *P. sphaerosporus* durchwuchs fast die ganze Schale mit mäßig dichtem Mycel, ohne aber Träger zu bilden. Als seine Hyphen die Peripherie der Schale erreichten, in der *Chaetocladium* nicht mehr gewachsen war, bogen sie um und wuchsen in die Mitte zurück. In allen Schalen, die nicht mit *Chaetocladium* beimpft worden waren, war *Pilobolus* nicht gekeimt. Diese Vorgänge wurden auf PrH (Lauge) beobachtet. Auf PrH (Säure) war keine Förderung durch *Chaetocladium* festzustellen. Offenbar kann der durch Hydrolyse zerstörte Wirkstoff von *Chaetocladium* unter gewissen Bedingungen resynthetisiert werden.

Wirkung von Wasserstoffsuperoxyd.

Versetzte man geklärten Preßsaft mit soviel Wasserstoffsuperoxyd, daß eine 0,1%ige Lösung entstand, so war nach kurzem Aufkochen keine Verminderung der Qualität des Substrates zu bemerken. Erst bei einer Verdoppelung der zugesetzten H₂O₂-Menge wurde der Nährboden inaktiviert. Eine gewisse Schwierigkeit bestand darin, möglichst alles Wasserstoffsuperoxyd zur Umsetzung zu bringen. Die Konzentration an Wasserstoffsuperoxyd, die nötig ist, einen PrH-Nährboden zu inaktivieren, liegt zwischen 0,15—0,2%. Sie ist abhängig von dem verwendeten PrH. Im Gegensatz zu *Pilobolus* vermag sich *Pilaira* auf einem solchen

¹ Vgl. Anm. 1, S. 409.

Substrat ausgezeichnet zu entwickeln. Vor der Behandlung mit H_2O_2 muß der Preßsaft aufgekocht werden, da sonst Katalasen das Wasserstoffsuperoxyd sofort zerlegen.

HE läßt sich ebenfalls durch H_2O_2 inaktivieren. Die Oxydation läßt sich durch Reduktion mit H_2S teilweise wieder rückgängig machen.

Für *P. umbonatus* erreichte der Nährboden die frühere Aktivität, während das Wachstum von *P. crystallinus* und *P. gracilis* schlechter war als auf unbehandeltem HE. Demnach scheint ein Teil der benötigten Stoffe reversibel oxydierbar zu sein.

Adsorption an carbo medicinalis.

Geklärter PrH wurde mit carbo medicinalis (Merck) behandelt; der Nährboden wurde jeweils mit der Kohle kurz aufgekocht und die Kohle dann über eine Filternutsche abfiltriert. Bei Zusatz von 0,5 g zu 150 cm³ PrH war das Wachstum unvermindert gut; mit 1,3% Kohle trat aber schon eine deutliche Verminderung des Wachstums ein. *P. umbonatus* begann wie auf HE zu wachsen, bildete zwar noch Trophocysten, aber diese wuchsen nicht mehr zu Trägern aus. Auch das Mycel von *P. crystallinus* wurde lichter, es wurden keine reifen Zygoten mehr gebildet. Die Kopulationen blieben auf einem frühen Stadium stehen. Trophocysten wurden zwar angelegt, keimten aber erst verspätet in geringer Zahl oder gar nicht zu Trägern aus. *P. gracilis* wuchs mäßig, bildete Gemmen und Gemmoidtrophocysten aber keinerlei Zygoten. Bei Zusatz von 2% Kohle erlosch das Wachstum der *Pilobolus*-Arten fast vollkommen: Mycel wurde nur ganz spärlich gebildet, die Hyphen waren zum Teil vakuolisiert und mit Öltröpfchen erfüllt; Träger oder Zygoten wurden nicht mehr entwickelt. Daraus ist zu schließen, daß mindestens einer der Wuchsstoffe von der Kohle adsorbiert worden ist. Versuche, die Substanz zu eluieren, wurden noch nicht unternommen.

Gegen eine mögliche Oxydation des Stoffes durch die Kohle spricht der Ausfall des folgenden Versuches. Eine Mischung eines PrH, der durch H_2O_2 oxydiert worden war, mit einem PrH, der mit Kohle behandelt wurde, ergab ein besseres Wachstum als jede der beiden Komponenten. Demnach kann der oxydable Stoff nicht mit dem adsorbierbaren identisch sein. Tab. 5 gibt eine Übersicht über diese Versuche.

Tabelle 5. Kombination von oxydiertem PrH mit solchem, der mit carbo medicinalis behandelt worden war.

	PrH + 1,5% H_2O_2	PrH + 4% C	PrH (H_2O_2) + PrH (C)
<i>P. crystallinus</i> . .	+++ 290 wenig Zygoten	0 bis + 0 0	++++ 430 mittlere Zygotenbildung
<i>P. umbonatus</i> . . .	+++ 20	0 bis + 0	++++ bis +++++ 200

Leider hatte die H_2O_2 -Konzentration nicht ausgereicht, um das Substrat vollständig zu inaktivieren. Dennoch ist eine deutliche Verbesserung der Trägerbildung durch die Kombination der beiden Nährböden festzustellen. Die Unterschiede in der Zygotenbildung von *P. crystallinus* sind leider nicht zahlenmäßig zu erfassen gewesen, da der Nährboden durch die H_2O_2 -Behandlung zu trübe geworden war.

Adsorption an Aluminiumoxyd.

Anreicherung an Al_2O_3 (Schering) nach den Methoden der chromatographischen Adsorptionsanalyse schlug fehl.

Pepsinbehandlung von Preßsaft.

Von besonderer Bedeutung für das optimale Wachstum von *Pilobolus Kleinii* hatte sich der bereits mehrfach erwähnte ungeklärte Preßsaft erwiesen. Mehrere Beobachtungen zeigten, daß vor allem dem Bodensatz — also den festen Partikeln — eine starke Wirksamkeit zukommt. Werden sie z. B. durch Filtrieren mit einer CHAMBERLAND-Filterkerze entfernt, so ist der Nährboden für Kopulationsversuche mit *P. Kleinii* unbrauchbar. Bei mikroskopischer Betrachtung des Bodensatzes konnten keine besonderen Strukturen wahrgenommen werden. Heu- oder Strohpartikel waren in ihm kaum enthalten. Wahrscheinlich besteht der Bodensatz hauptsächlich aus Bakterien und anderen Organismen der normalen Darmflora des Pferdes.

Tabelle 6. Wirkung einer Pepsinandauung von Pferdemistpreßsaft auf das Wachstum einiger *Pilobolus*-Arten.

	„Satz“	„Fl“	„Satz-Pepsin“	„Fl-Pepsin“
<i>P. crystallinus</i> . . .	+++ bis ++++	0	+++ bis ++++	+ bis ++
	250	0	300	48
	mehrere	0	deutliche	0
	Zygoten		Zygotenlinie	
<i>P. gracilis</i>	+++	0	+++	+ bis ++
	230	0	200	0
<i>P. umbonatus</i> . . .	+++ bis ++++	0	+++	+++
	180	0	130	5

Mit Hilfe von Pepsin wurde versucht, die im Bodensatz („Satz“) enthaltenen Wuchsstoffe freizusetzen. Aus Tab. 6 ist eine deutliche Förderung durch die flüssige Phase nach der Pepsinandauung („Fl-Pepsin“) ersichtlich. Durch die Pepsinbehandlung ist offensichtlich ein Teil der im Bodensatz gebundenen Wuchsstoffe frei geworden, der dann in Lösung gehen konnte und in der flüssigen Phase nachweisbar war. Die Wirkung des festen Sedimentes ist sowohl vor („Satz“) wie nach der Pepsinbehandlung („Satz-Pepsin“) sehr stark. Es wurde durch das Pepsin nur ein kleiner Teil der Wuchsstoffe freigesetzt. Das Wachstum

auf dem „Fl-Pepsin“-Nährboden erinnerte an das auf HE. Von den Brocken des Sedimentes, das sich nicht völlig gleichmäßig über die Platten verteilt hatte, ging eine starke Aktivität aus. Die Sporangienträger bildeten sich fast ausschließlich in unmittelbarer Nähe dieser Klümpchen. Das Mycel von *P. umbonatus* wuchs an diesen Brocken so dicht, wie es sonst nur unter der Einwirkung gewisser Bakterien beobachtet wurde. Pepsin allein hatte keine merkliche Wirkung.

Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß die von *Pilobolus Kleinii* benötigten Wachstumsstoffe zum großen Teil in gebundener Form vorkommen und durch Pepsinbehandlung nur teilweise freigemacht werden können.

IV. Die Bedeutung der Pentosane für das Wachstum von *Pilobolus*.

Da BERSA zu dem Schluß kam, daß besonders Pentosane für das Wachstum von *Pilobolus Kleinii* von Bedeutung seien, war es erforderlich, diesen Stoffen einige Beachtung zu schenken. Bei einer kritischen Durchsicht der Ergebnisse von BERSA tauchten jedoch Zweifel an der Berechtigung dieser Hypothese auf. Es können an dieser Stelle die Ergebnisse von BERSA nicht im einzelnen diskutiert werden. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß alle seine Ergebnisse mit der Annahme eines besonderen Wirkstoffbedarfes von *Pilobolus* zwanglos zu erklären sind.

Interessant ist noch eine kurze Mitteilung von BERSA, wonach ein Xylan-Präparat, das im Sommer 1928 hergestellt worden war, gegenüber einem solchen aus dem Frühjahr 1929 an Nährwert abgenommen hatte. Allein schon diese Beobachtung ist mit der Annahme, daß Pentosane die entscheidenden Nährstoffe seien, unvereinbar. Sie deckt sich aber mit unseren Befunden, die eine Abnahme der Aktivität bei gelagertem Heu ergeben hatten. Gegen Pentosane als unentbehrliche Nährstoffe spricht ferner die leichte Löslichkeit der im Heu und Stroh enthaltenen aktiven Substanzen. BERSA selbst fand, daß die im Weizenstroh vorkommenden fördernden Stoffe leicht löslich sind.

Um zu prüfen, ob tatsächlich die im Heu enthaltenen Pentosane eine Wirkung auf das Wachstum von *Pilobolus* auszuüben vermögen, setzte ich folgenden Versuch an:

Zerkleinertes Heu wurde im Soxhlet mit 70%igem Alkohol erschöpfend extrahiert. Der vom Alkohol befreite Extrakt zeigte die übliche Förderung der *Pilobolus*-Arten. Die extrahierten Heupartikelchen wurden für sich in S-Agar aufgeschwemmt, dieser sterilisiert und mit dem Heu zu Platten ausgegossen. Diese wurden mit *P. umbonatus*, *P. crystallinus* und *P. gracilis* beimpft.

Die Pilze wuchsen nur ganz spärlich wie auf reinem „S“. Die Heuteile übten keinen Einfluß auf das Wachstum aus.

Um die mögliche Anwesenheit von Pentosen bzw. Pentosanen im extrahierten Heu und in den Heuextrakten nachzuweisen, benutzte ich die Phloroglucin-HCl-Reaktion und den Nachweis mit Orcin nach BIAL. Zugleich wurde auf reduzierende Substanzen mit FEHLINGScher Lösung geprüft. In die Untersuchung wurde noch ein Heuextrakt einbezogen, der die Adsorptionssäule mit Al_2O_3 passiert hatte (HE-Chromatographie). Tab. 7 zeigt den Ausfall der Nachweisreaktion bei den verschiedenen Extrakten.

Tabelle 7. Zusammenstellung der Nachweisreaktionen an verschiedenen Heuextrakten

Nachweis mit:	HE	HE (Chromatographie)	im Soxleth-extrahiertes Heu
FEHLINGScher Lösung.	positiv	positiv	nicht geprüft
Orcin (nach BIAL)	negativ	negativ	positiv
Phloroglucin und Salzsäure	negativ	negativ	positiv

Danach sind in den Heuextrakten weder Pentosen noch Pentosane in nennenswerten Mengen enthalten. Die Orcin-Reaktion ist sehr empfindlich und erfaßt noch 0,005% Pentose. Demgegenüber war die Reaktion der ausgelaugten Heubestandteile kräftig positiv, wie es zu erwarten war, da Pentosane durch 70% igen Alkohol nicht extrahierbar sind.

Somit dürfte feststehen, daß weder Pentosen noch Pentosane die für das Wachstum von *Pilobolus* entscheidenden Substanzen sind. Ob die *Pilobolus*-Arten instande sind, Pentosane abzubauen und deren Spaltprodukte für ihre Ernährung zu verwerten, wenn ihnen gleichzeitig die notwendigen Wachstumsstoffe geboten werden, läßt sich vorläufig nicht

sicher entscheiden und müßte erst gesondert untersucht werden. Desgleichen bedürfen die Angaben BERSAS bezüglich der Verwertbarkeit der anderen Nährstoffe einer neuen Untersuchung.

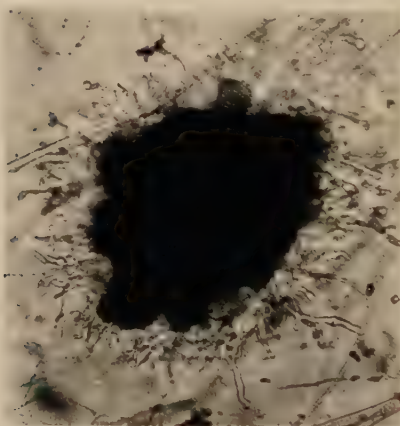


Abb. 2. Mycelförderung von *Pilobolus* durch Bakterien V.

V. Die Wirkung von Bakterien auf das Wachstum von *Pilobolus*.

Wie an anderer Stelle bereits ausführlich geschildert (LYR 1952, 1953), hatten nicht näher bestimmte Bakterien eine Sexualreaktion zwischen den *Kleinii*-Stämmen VI und XIV₁ hervorgerufen. Eine Förderung des Mycelwachstums oder der Tropho-

cystenbildung durch diese Bakterien, die ich mit Z bezeichnet habe, war nicht festzustellen. Die Reinkultur dieser Bakterien, die aus Pferdemist isoliert worden waren, ist nicht gelungen. Es konnten daher mit ihnen keine weiteren Versuche unternommen werden.

Sehr früh fiel bei der Durchsicht verunreinigter Platten eine zweite Bakterienart auf, die die vorläufige Bezeichnung V erhielt. Ihre Wirksamkeit erstreckt sich vor allem auf das Mycelwachstum. Wuchsen die Hyphen eines *Pilobolus* in eine solche Bakterienkolonie hinein, so verzweigten sie sich darin sehr üppig und bildeten in der Umgebung der

Kolonie ein dichtes Hyphengeflecht (Abb. 2). *P. crystallinus* und *P. gracilis* bildeten unter dem Einfluß der Bakterien mehr oder weniger zahlreiche Trophocysten (Abb. 3). Eine Anregung der Zygotenbildung von

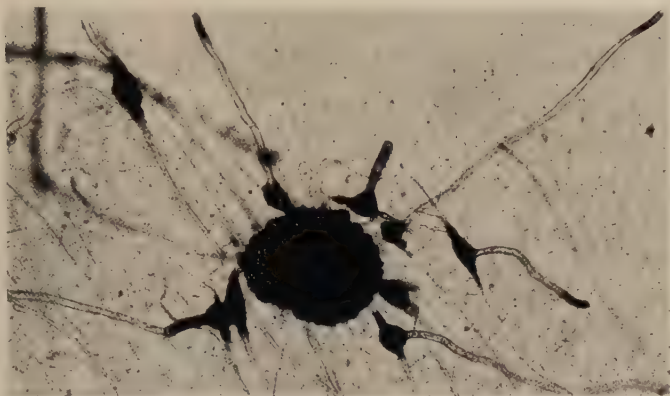


Abb. 3. Trophocystenbildung von *P. crystallinus typicus* unter dem fördernden Einfluß der Bakterien *V*.

P. gracilis oder der *Kleinii*-Stämme durch Stamm *V* konnte nicht festgestellt werden. Bei *P. crystallinus* bewirkten die Bakterien hingegen neben einer Wachstumssteigerung auch eine Vermehrung der Zygotenbildung. Ähnlich wie Stamm *V* wirkten noch andere Bakterien, die aber nicht genauer untersucht wurden. Ferner isolierte ich aus Pferdemist einen weiteren Bakterienstamm (*U*), der weniger stark auf die Mycelbildung, dafür umso üppiger auf die Trägerbildung fördernd wirkte (Abb. 4). Ein besonderer Einfluß auf die Zygotenbildung konnte auch hier nicht bemerkt werden.

Eine vierte Bakterienart (*Y*) fiel dadurch auf, daß sie die Trägerbildung von *P. umbonatus* auf einem HE-Agar stark förderte. Wie Abb. 5 zeigt, hatten sich die Bakterien zufällig nur über einen Sektor der Agarplatte

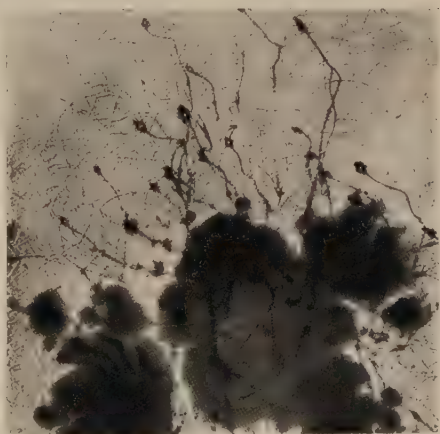


Abb. 4. Förderung der Mycel- und Trägerbildung von *P. gracilis* auf PrH durch die Bakterien *U*.

und des Mycelareals von *P. umbonatus* ausgebreitet, während der übrige Teil bakterienfrei war. In dem Bakteriensektor entwickelte *P. umbonatus* zahlreiche Sporangienträger, was er sonst auf HE-Agar nicht zu tun

pflegt. Insgesamt wurden in dem Bakteriensektor, der höchstens ein Viertel der Platte einnahm, 138 Träger gebildet und auf der ganzen übrigen Platte nur 5. Das Mycel sah in dem geförderten Sektor wesentlich gesünder aus und hatte keine Öltröpfchen in den Hyphen.

Die Kultur der einzelnen Bakterienstämme erwies sich leider als recht schwierig, da sie auf synthetischen Nährböden überhaupt nicht und auf anderen oft nur schlecht wuchsen. Die Erforschung ihrer Wirkungen auf *Pilobolus* wurde dadurch behindert. Ein Teil der Bakterien war nicht dauernd in Kultur zu bringen und wuchs nach der 2. oder 3. Passage nicht mehr an.

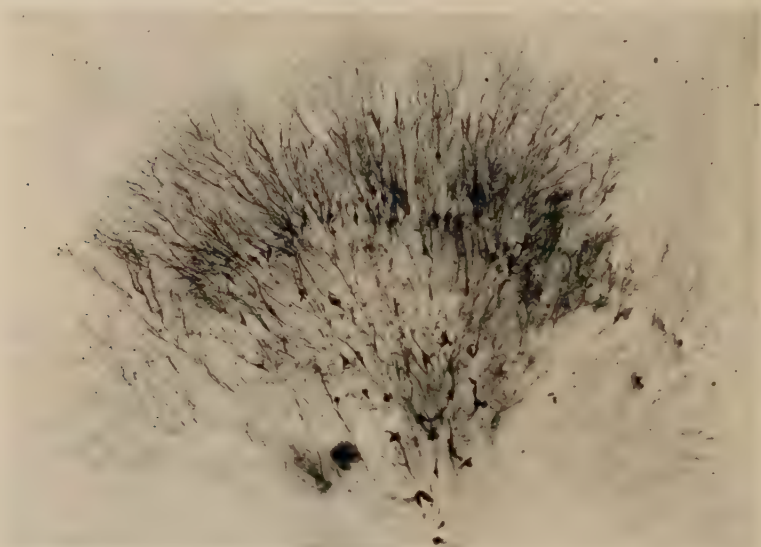


Abb. 5. Sektoriale Förderung von *P. umbonatus* durch die Bakterien Y auf HE-Agar.

In Tab. 8 ist eine Zusammenstellung der Wirkung der einzelnen Bakterienarten auf drei verschiedenen Nährböden gegeben.

Als völlig wirkungslos erwies sich ein aus menschlichen Faeces isolierter Stamm von *Bacterium coli*, den mir freundlicherweise das Hygienische Institut zur Verfügung stellte.

Wie früher geschildert wurde, ist das Wachstum auf einem Weizen- und Pfifferling-Agar normalerweise sehr schlecht oder praktisch gleich Null. Daher lassen sich hier die Wirkungen der Bakterien mit besonderer Deutlichkeit erkennen. Bemerkenswert ist, daß sich Unterschiede in der Wirkung der Bakterien auf verschiedenen Nährböden und gegenüber den einzelnen *Pilobolus*-Arten zeigen.

Stamm V zeichnet sich besonders durch seine starke Mycelförderung aus. Er regt die Mycelbildung von *P. crystallinus* und *P. gracilis* auf Heuextrakt- und Weizenagar an. Dagegen ist er unwirksam gegenüber

Tabelle 8. Die Wirkung der einzelnen Bakterienstämme auf drei *Pilobolus*-Arten auf verschiedenen Substraten.

	Bakterien	<i>P. umbonatus</i>	<i>P. gracilis</i>	<i>P. crystallinus</i>
Auf HE-Agar (8 cm ³ HE auf 100 cm ³ S).	<i>U</i>	++++	++ keine Zygoten	nicht geprüft
	<i>Y</i>	+++ ...	+++ keine Zygoten	nicht geprüft
	<i>V</i>	0 bis + .	+++++ keine Zygoten	+++++ Zygotenförderung
	<i>Bact. coli</i>	0 0	0 bis + 0	0 0
Auf Weizen-Agar (8 cm ³ Extrakt aus keimendem Weizen in 100 cm ³ S).	<i>U</i>	+++++	+ 0 keine Zygoten	0 0 keine Zygoten
	<i>Y</i>	+ 0 0	0 0	0 0
	<i>V</i>	0 0	+++++ keine Zygoten	+++++ Zygotenförderung
Auf Pfefferling-Agar (100 cm ³ S + 20 cm ³ Pfefferling-extrakt)	<i>Y</i>	++++	0 0	0 0

Mit dem Symbol + sei wieder das Mycelwachstum bezeichnet, während durch die Punkte die Intensität der Trägerbildung dargestellt werden soll. (· = sehr wenige Träger, = sehr üppige Trägerbildung.) Auf einem HE-Agar ohne Bakterien vermögen die *Piloboli* bekanntlich ganz gut zu wachsen. In die Tabelle wurde jedoch nicht das Gesamtwachstum, sondern nur die speziellen Wachstumsförderungen durch die Bakterien aufgenommen.

P. umbonatus. Bemerkenswert ist ferner die Tatsache, daß der Stamm *V* eine Zygotenbildung von *P. crystallinus* auf Weizenagar bewirkt. *P. gracilis* und *P. Kleinii* sind weder auf diesem noch auf anderen Substraten durch Stamm *V* zu einer vermehrten Zygotenbildung zu bringen. Der Einfluß der Bakterien *V* macht sich bereits wenige Tage nach dem Aufimpfen auf eine Agar-Platte bemerkbar. Offenbar kann der aktive Stoff leicht abgegeben werden.

Von sehr starker Wirksamkeit ist auch der Stamm *U*. Er fördert das Mycelwachstum und die Trägerbildung von *P. umbonatus* auf HE- und Weizen-Agar. In einer solchen Bakterienkolonie entwickeln sich je nach

ihrer Ausdehnung oft 60—150 Sporangienträger je Tag, während auf der ganzen übrigen Platte überhaupt keine gebildet werden. Der Einfluß der Bakterien macht sich aber erst 10—14 Tage nach dem Aufimpfen geltend und erreicht etwa nach 3 Wochen seinen Höhepunkt, um dann einige Zeit unvermindert anzuhalten. Bei *P. gracilis* äußert sich die Einwirkung der Bakterien *U* durch eine etwas gesteigerte Mycelbildung und durch eine reichliche Sporangienproduktion. Eine Förderung findet aber nur auf HE- oder PrH-Nährböden statt und nicht auf Weizenagar. Gleiches gilt für *P. sphaerosporus*. Eine Anregung der Zygotenbildung konnte in der *Kleinii*-Gruppe nicht festgestellt werden.

Der Stamm *Y* ist nicht von so starker Wirkung wie die beiden vorigen. Er ähnelt in seinem Verhalten dem Stamm *U*. Die Auslösung der Sporangienträgerbildung bei *P. umbonatus* durch den Stamm *Y* wurde schon ausführlich beschrieben. Eine Wirkung auf *P. gracilis* ist zwar vorhanden, aber nicht sehr stark.

Der zygotenfördernde Bakterien-Stamm *Z* ging, wie bereits mitgeteilt, leider ein und konnte daher zu eingehenderen Untersuchungen nicht benutzt werden.

Eine genaue Bestimmung der einzelnen Bakterien-Stämme war mir unter den gegebenen Verhältnissen nicht möglich. Im folgenden sollen nur die wichtigsten morphologischen und physiologischen Eigenschaften der einzelnen Formen beschrieben werden. Alle Arten sind zur Familie der *Bacillaceen* zu rechnen, da sie Sporen bilden.

Stamm U. Morphologie der Einzelzelle: $1\ \mu$ breite und $1,5\text{--}2\ \mu$ lange, plumpe, unbegeißelte Stäbchen, die Ketten von sehr verschiedener Länge bilden können. Endosporen meist endständig, bewirken keine Auftreibung des Körpers. Grampositiv. — Form und Aussehen der Kolonie auf Heudekokt-Agar: Oberfläche glänzend, dick, saftig, weißlich-gelblich, matt durchscheinend. Ränder lockig gewellt. — Wachstum gut auf PrH, Heudekokt, Leberdekot. Kein Wachstum auf S und S + Hefedekot. — Optimale Temperatur $30\text{--}37^\circ$. — Optimaler pH-Wert 7—7,5. (Chemische Leistungen siehe Tab. 9.)

Stamm Y. Morphologie der Einzelzelle: $0,8\text{--}1\ \mu$ dick und $2,7\text{--}4\ \mu$ lang. Endosporen mittel- oder endständig. Unbegeißelte Stäbchen zu Ketten von verschiedener Länge zusammengelagert. Grampositiv. — Aussehen der Kolonien (auf Heudekokt-Agar): Oberfläche glänzend. Kolonie saftig, bräunlich, durchscheinend. Das Innere völlig homogen, Ränder glatt. Kolonien in Gelatine homogen bräunlich, Ränder glatt, oft mit wurzelartigen Auszweigungen. — Wachstum wie Stamm *U*. Kultur in synthetischen Medien auch mit Zusatz von verschiedenen Vitaminen, Casein, Nuclein und Albumin nicht gelungen. — Optimale Temperatur: $30\text{--}37^\circ$. — Optimaler pH-Wert bei 7.

Stamm V. Morphologie der Einzelzelle: $0,6\text{--}0,9\ \mu$ dick, $2,5\text{--}3,5\ \mu$ lang. Sporenbildende Stäbchen $1,1\ \mu$ dick. Endosporen mittel- oder endständig, bewirken bisweilen eine geringe Auftreibung des Stäbchens. Unbegeißelt. Grampositiv, wenigstens in jungen Kolonien. — Aussehen der Kolonien (auf Heudekokt-Agar): Oberfläche glänzend, Kolonien bräunlich, durchscheinend, in sich homogen, mit glattem Rand. Im Agar glattrandig, braun, breit linsenförmig. Aussehen auf PrH-Agar:

oberfläche glänzend, Kolonien weiß-gelblich, undurchsichtig, Ränder glatt. Wachstum wie Stamm U aber nicht so kräftig. — Optimale Temperatur 30—37°. — Optimaler p_H -Wert bei 7.

In Tab. 9 ist das Wachstum der Bakterienstämme auf einigen in der Bakteriologie gebräuchlichen Nährböden und die wichtigsten chemischen Leistungen zusammengestellt¹.

Tabelle 9. Übersicht über das Wachstum und die chemischen Leistungen der einzelnen *Bacillus*-Stämme.

	<i>Y</i>	<i>U</i>	<i>V</i>
Wachstum in LIEBIG-Bouillon (p_H 7,2)	klare Flüssigkeit, schwacher, festsitzender Bodenbelag	Flüssigkeit kaum getrübt, Bodensatz leicht aufwirbelbar	leichte Trübung, einzelne Flocken
Wachstum in Traubenzucker-Bouillon mit Gärröhrchen	wie oben keine Gasbildung!	wie oben keine Gasbildung!	wie oben keine Gasbildung!
Säurebildung in Traubenzucker-Bouillon (p_H 7,2)	0	0	nach 3 Tagen p_H 6!
Indolbildung in Trypsin-Bouillon (KOVACSSches Reagens)	0	0	0
H ₂ S-Bildung	0	0	0
Gelatineverflüssigung	0	0	0
Verhalten in Lackmusmilch	Milch unverändert	Milch unverändert	Milch unverändert
Verhalten in Methylenblau-milch	keine Entfärbung	keine Entfärbung	keine Entfärbung
Säurebildung in Milch	0	0	0—+
Farbstoffbildung	0	0	0

Nicht alle aus dem Pferdemit isolierten Bakterien wirkten fördernd auf das Wachstum von *Pilobolus*. Die meisten verhielten sich neutral. Einige hemmten sogar das Wachstum. Wenn jedoch durch eine aufgeimpfte Bakterienkolonie keine Wachstumsförderung erzielt werden konnte, so braucht das allerdings noch nicht zu besagen, daß diese Bakterien keine fördernden Substanzen enthalten, sondern nur, daß sie solche nicht nach außen abscheiden.

Die Wirkung von Darmbakterien auf *Pilobolus* soll noch Gegenstand weiterer Untersuchungen werden.

¹ Für eine Bestimmung oder gar Neubeschreibung reichen diese Angaben freilich nicht aus. Eine solche war schon aus Mangel an neuer Literatur nicht möglich.

VI. Diskussion des ernährungsphysiologischen Verhaltens von *Pilobolus*

Wenn auch die Untersuchungen über die Ernährungsphysiologie mit den vorliegenden Ergebnissen noch nicht als abgeschlossen zu betrachten sind, so soll doch versucht werden, die bisher bekannten Tatsachen miteinander in Einklang zu bringen.

Von allen untersuchten Naturstoffen erwiesen sich allein Mistpreßsäfte und Heuextrakte als günstig für das Wachstum von *Pilobolus*. An Nährstoffen verdient das Pepton einige Beachtung. Eine entscheidende Erweiterung unserer Kenntnisse von den ernährungsphysiologischen Ansprüchen dieser Pilzgattung brachte die Feststellung, daß Bakterien das Wachstum und die Entwicklung der *Pilobolus*-Arten in charakteristischer Weise beeinflussen. Die Diskussion der Ernährungsphysiologie kann sich daher auf die eben genannten Faktoren beschränken.

Wie wir sahen, verhalten sich die einzelnen Arten hinsichtlich ihrer Ansprüche an das Substrat durchaus nicht einheitlich. Die bisher untersuchten *Pilobolus*-Arten lassen sich in mindestens drei Gruppen aufteilen.

Den ersten Typus stellt *P. crystallinus* subsp. *typicus* dar (Typus I). Eine ihm ähnelnde Form wurde bisher nicht gefunden. Er ist offenbar der anspruchsloseste Vertreter. Zwar vermag auch er nicht auf rein synthetischen Nährböden zu wachsen, aber schon auf relativ einfachen Nährböden wie Malz-Pepton-Agar oder Heuextrakt-Agar (HE) zeigt er eine normale und vollständige Entwicklung, indem er auch Zygoten bildet.

Typus II wird durch *P. umbonatus* und *P. crystallinus* subsp. *anisosporus* repräsentiert. Für diese Pilze sind die Stoffe des Heuextraktes, die ich mit dem Buchstaben A bezeichnen möchte, offenbar nicht ausreichend für ein normales Wachstum. Auch eine Steigerung der HE-Zusätze vermochte keine Trägerbildung zu bewirken. Anscheinend fehlen dem Heuextrakt gewisse Wuchsstoffe, die von Typus II benötigt werden.

Zu Typus III zählen die restlichen Arten, also *P. gracilis*, *P. Kleinii*, *P. sphaerosporus* und möglicherweise auch *P. longipes*. Die beiden letzten Arten sind aber noch zu wenig untersucht, als daß sich Abschließendes aussagen ließe.

Auch Typus III benötigt zu seinem Wachstum den Stoff (oder die Stoffe) A. Jedoch ist dieser ebenso wie bei Typus II nicht für ein optimales Wachstum ausreichend. Gewisse Befunde sprechen dafür, daß der Wachstumsfaktor A durch Wasserstoffsuperoxid zerstört werden kann.

Für die Förderung der Trägerbildung von Typus II und III scheint ein weiterer Stoff wichtig zu sein, den ich mit B bezeichnen möchte. Er kommt im Mistpreßsaft und im Malz-Pepton-Gemisch vor und ermöglicht *P. umbonatus* eine normale Sporangienträgerproduktion. Die Wirkung auf *P. gracilis* ist nicht so stark.

Die günstige Wirkung von Pepton beruht wahrscheinlich in erster Linie auf dem Gehalt an Wuchsstoff A und weniger auf seinem Nährstoffgehalt. Dadurch würden sich auch die unterschiedlichen Ergebnisse von KRAFCZYK einerseits und SCHOPFER (1927) und RONSDORF (1931) andererseits erklären lassen.

Ob für den Typus II mit den Stoffen A und B bereits ein optimales Wachstum möglich ist, läßt sich erst entscheiden, wenn auch eine Zygotenbildung beobachtet worden ist.

Für den Typus III scheinen die Faktoren A und B nicht zu genügen, da viele Stämme von *P. Kleinii* und wahrscheinlich auch *P. sphaerosporus* und *P. longipes* für die Zygotenbildung einen dritten Stoff C benötigen, der in gebundener Form im Bodensatz des Mistpreßsaftes vorliegt. Ob der Stoff C eine ganz spezifische Förderung der Sexualreaktion bewirkt, läßt sich vorläufig noch nicht entscheiden, weil gerade über ihn noch am wenigsten bekannt ist.

Gestützt werden die dargelegten Ansichten über die stofflichen Ansprüche der einzelnen *Pilobolus*-Arten durch die Versuche mit den Bakterien-Stämmen. Diese Ergebnisse, die im wesentlichen in Tab. 8 zusammengefaßt sind, lassen sich zwanglos mit den eben geschilderten Anschauungen vereinbaren. Danach dürfte Stamm V vornehmlich den Faktor A ausscheiden. Dieser geht leicht in das Substrat über und bewirkt eine starke Mycelbildung bei Typus I und III. Auch die Trophocystenbildung wird begünstigt. Eine Zygotenförderung tritt jedoch nur bei *P. crystallinus* (Typus I) ein, was wiederum nur beweist, daß bei dieser Art die Sexualreaktion lediglich von der Intensität des Mycelwachstums abhängig ist. Auf die Organismen von Typus II sind die Bakterien V praktisch unwirksam. Die eben beschriebenen Verhältnisse lassen sich auf HE-Agar ebenso wie auf Weizen-Agar nachweisen. Letzterer dürfte frei von Faktor A sein. *P. umbonatus* und *P. crystallinus* subsp. *anisosporus* (also die Pilze vom Typus II) scheinen den Faktor A entweder nur in geringem Umfange zu benötigen oder sie sind mit ihm allein nicht wachstumsfähig, sondern brauchen unbedingt noch andere Faktoren.

Für die Stämme U und Y muß man eine Produktion von Faktor B annehmen. Sie wirken auf den Typus II durch eine starke Förderung des Mycels und der Sporangienproduktion, und zwar sowohl auf HE- wie auf Weizen- und Pfifferling-Agar. Auf Weizen-Agar ist allerdings die Wirkung von Y gering. *P. gracilis* wird auf HE-Agar deutlich in der Trägerbildung gefördert, während auf Weizen-Agar eine Förderung von *P. gracilis* und *P. crystallinus* subsp. *typicus* unterbleibt. (Es fehlt Faktor A!) Faktor B scheint nicht so leicht abgegeben werden zu können, da eine deutliche Förderung durch die Bakterien U und Y erst nach einiger Zeit einsetzt. Vielleicht ist er in den Bakterienleibern gebunden

und muß erst durch autolytische Prozesse freigemacht werden. Dafür sprechen auch die Versuche der Pepsinandauung. Brocken des gewaschenen Bodensatzes des Mistpreßsaftes wirkten auf *P. umbonatus* wie die Bakterien *U*.

Eine Förderung der Zygotenbildung durch die Bakterien *U* und *Y* konnte nicht festgestellt werden.

Es ist daher das Vorhandensein eines dritten Faktors C wahrscheinlich. Da der Bakterien-Stamm *Z*, der offenbar den Stoff C produzierte, eingegangen ist, ließen sich in dieser Richtung leider keine weiteren Versuche anstellen. Abb. 6 zeigt sehr instruktiv die Wirkung von Bakterien vom Typus *Z*. Gleichzeitig ist aus der Abbildung zu entnehmen, daß der mycelfördernde Faktor A mit dem zygotenbildenden Faktor C nicht

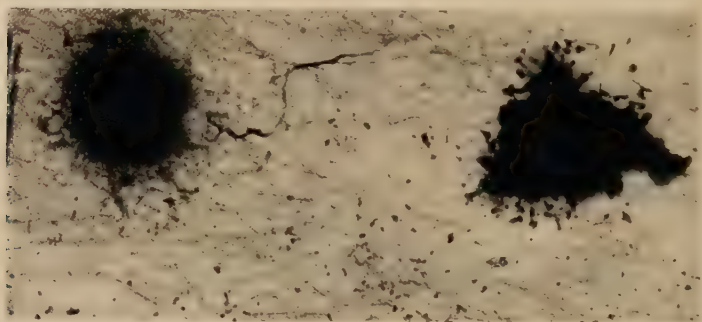


Abb. 6. Förderung des Mycelwachstums (links) und der Zygotenbildung (rechts) von *P. gracilis* auf PrH durch unbekannte Bakterien. Die dunklen Punkte in der Abbildung, vornehmlich um die rechte Kolonie, sind Zygoten.

identisch sein kann. Die im Bilde rechte Bakterienkolonie (*Z*) ließ unter ihrem Einfluß zahlreiche, kräftige Zygoten entstehen, während die linke Kolonie (vom Typus *V*) — obwohl auch in der Kopulationszone gelegen — nur eine Mycelförderung hervorrief. Der Wachstumsfaktor C ist offenbar in gebundener Form im Bodensatz des Mistpreßsaftes enthalten. Möglicherweise ist der quantitative Bedarf der verschiedenen Formen von *P. Kleinii* an diesem Faktor verschieden groß. Dadurch ließen sich die Unterschiede in der Intensität der Sexualreaktion erklären. Abschließend möchte ich die eben geäußerten Anschauungen in dem Schema der Tab. 10 zusammenfassen.

Wenn diese Auffassung auch noch nicht exakt bewiesen ist, so vermittelt sie doch ein einheitliches widerspruchsfreies Bild, das als Arbeitshypothese für neue Untersuchungen brauchbar ist.

Über die Natur der einzelnen Faktoren läßt sich noch nicht viel aussagen. Mit den bisher geprüften Vitaminen können sie nicht identisch sein. Vorkommen und Eigenschaften lassen darauf schließen, daß es sich mindestens zum Teil um noch unbekannte Wachstumsfaktoren handelt.

Tabelle 10. Übersicht über die von den einzelnen *Pilobolus*-Arten benötigten unbekannten Wachstumsfaktoren.

Faktor:	Vorkommen:	gebildet durch Bakterien:	benötigt von:		
			Typus I	Typus II	Typus III
A	HE; gekl. PrH; Pepton; Bodensatz	V	+	(+ ?)	+
B	gekl. PrH (zeitweilig); Malzpepton; Bodensatz	U, Y	(0) ?	+	+
C	bisweilen geringfügig in geklärtem PrH; Bodensatz	Z	0	?	+

Das Vorkommen in grünen Pflanzenteilen könnte vielleicht auf Porphyrine oder Abbauprodukte hindeuten. Möglicherweise kommen auch Koproporphyrine in Betracht, deren Bildung durch Darmbakterien bekannt ist.

Über den Einfluß von Bakterien auf koprophile Pilze ist nur wenig bekannt, obwohl dieses Phänomen verbreiteter sein dürfte als man bisher annimmt. Eine einschlägige Beobachtung schildert MOLLIARD (1903) von einer *Ascobolus*-Art. Eine weitere Beobachtung in dieser Richtung machte DELITSCH bei Kulturversuchen mit koprophilen *Ascomyceten*. Sicherlich liegen noch mehr derartige Beobachtungen vor, die gelegentlich bei der Kultur koprophiler Pilze gemacht wurden (VODERBERG).

Unter Berücksichtigung der Bakterienwirkung lassen sich verschiedene Eigentümlichkeiten bei der Kultur von *Pilobolus* besser verstehen. Die Verschlechterung des Pferdemistes in den Frühjahrsmonaten, von der schon öfters die Rede war, könnte einmal die direkte Folge des Mangels an Grünfutter sein, da im Gras aktive Substanzen (Faktor A) enthalten sind. Jedoch finden sich diese bekanntlich auch im Heu und Stroh, und es ist fraglich, ob durch die relativ kurze Lagerzeit im Winter schon ein Verlust an aktiven Stoffen eingetreten ist. Immerhin ist diese Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen. Wahrscheinlicher erscheint mir aber, daß sich die Darmflora durch einen Wechsel der Futterzusammensetzung in einer Weise verändert hat, die für das Wachstum von *Pilobolus* ungünstig ist. Daß sich durch einen Wechsel des Futters die Darmflora rasch ändert, ist durch Untersuchungen an unseren Haustieren bekannt (KREIPE, SCHEUNERT und SCHIEBLICH).

Das Vorkommen von *P. sphaerosporus* auf Schlamm und von *P. oedipus* auf faulenden Algen wird wahrscheinlich durch Fäulnisbakterien ermöglicht, deren Wuchsstoffausscheidungen von *Pilobolus* ausgenutzt werden. Abgendedokte selbst hatten nur eine sehr geringe Wirkung auf *P. sphaerosporus*.

Eine weitere Untersuchung dieser Probleme verspricht eine Fülle von interessanten Ergebnissen, deren Bedeutung weit über den engen Rahmen der *Pilobolus*-Kultur hinausgehen dürfte. Wie *Pilobolus*, so sind wahrscheinlich eine große Zahl von koprophilen Pilzen auf die Zufuhr von bisher noch unbekannten Wachstumsfaktoren angewiesen, die wenigstens zum Teil aus der normalen Darmflora der Herbivoren stammen. Eine Aufklärung dieser Substanzen wäre sehr interessant, vor allem auch im Hinblick auf die Bedeutung, die sie für unsere pflanzenfressenden Haustiere haben können.

Zusammenfassung.

1. Alle bisher untersuchten *Pilobolus*-Arten sind auf rein synthetischen Nährböden nicht wachstumsfähig, sondern bedürfen der Zufuhr einer je nach Art verschiedenen Zahl von bisher noch unbekannten Substanzen von Wuchsstoffcharakter. *Pilobolus* gehört demnach zu den auxoheterotrophen Organismen.

2. Die Vitamine Thiamin, Adermin, Nicotinsäureamid, Inosit, Pantothersäure, p-Aminobenzoessäure und Vitamin K erwiesen sich als völlig unwirksam für *Pilobolus*.

3. Den Pentosanen, die nach BERSA das Wachstum von *P. Kleinii* fördern sollen, kommt keine Bedeutung für das *Pilobolus*-Wachstum zu.

4. Die noch unbekannten Wachstumsfaktoren kommen zum Teil in Heu, Stroh und grünen Pflanzenteilen vor, nicht dagegen in wäßrigen Extrakten von Bäckerhefe, Leber, Pflaumen, Pfifferlingen, Algen und im Pferdeharn. Eine besonders reichliche und umfassende Wuchsstoffquelle ist der Bodensatz eines Pferdemistpreßsaftes. Er besteht zum großen Teil aus Bakterien der Darmflora des Pferdes. Diese enthalten — teilweise in gebundener Form — die von *Pilobolus* benötigten Substanzen.

5. Bestimmte *Bacillus*-Arten vermögen verschiedene dieser Wuchsstoffe auszuschcheiden und dadurch das Wachstum von *Pilobolus* in eigentümlicher Weise anzuregen. Aus Pferdemist wurden drei besonders aktive Bakterienstämme isoliert und deren wichtigste morphologische und physiologische Eigenschaften beschrieben.

6. Für die Gesamtheit der unbekannten Wuchsstoffe ließen sich folgende Eigenschaften ermitteln: Organische Körper, wasserlöslich (z. T. aber an Eiweiß gebunden und dann nicht löslich), löslich in 70% igem Äthylalkohol, unlöslich in Petroläther, in wäßriger Lösung beständig gegen Temperaturen bis mindestens 130° C, zerstörbar durch 0,2% H_2O_2 oder durch 0,06 normale Salzsäure oder Natronlauge, adsorbierbar durch 2% carbo medicinalis (Merck), dagegen nicht adsorbierbar durch Al_2O_3 (Schering).

7. Für die *Kleinii*-Gruppe wurde ein Bedarf von wenigstens drei verschiedenen Wuchsstoffen angenommen. Versuche zu ihrer Trennung wurden noch nicht unternommen. Ungewiß ist noch, wie sich die oben beschriebenen Eigenschaften auf die einzelnen Faktoren verteilen.

Nachtrag: Nach Fertigstellung der vorliegenden Arbeit wurden mir zwei amerikanische Arbeiten zugänglich, die sich ebenfalls mit der Ernährungsphysiologie von *Pilobolus* befassen. PAGE arbeitete mit einem Stamm, den er als *P. Kleinii* bestimmt hatte. Er entwickelte ein „synthetisches“ Nährmedium, das sich aus Asparagin, N-Acetat und Hämin zusammensetzt. Letzte Verbindung hatte sich als besonders wirksam erwiesen. Von anderen Naturstoffen zeigten nur Grasextrakte eine schwache Aktivität. Durch entsprechenden Zusatz einer Reihe von Stoffen wurde deren Brauchbarkeit als Nährstoffe geprüft. Als C-Quelle bewährten sich vor allem gewisse Fettsäuren, darunter auch die Essigsäure. Vitamine des B-Komplexes, B₁₂ und Folsäure waren unwirksam. Nur Thiamin (B₁) soll für die Trägerbildung von Bedeutung sein. Als N-Quelle erwies sich Asparagin als am besten. PAGE nimmt zwei unbekannte Wachstumsfaktoren an, von denen Faktor I im Hämin enthalten ist und vermutlich ein Porphyrin darstellt. Faktor II ist akzessorisch wirksam und kommt im Dung vor.

HESELITINE und Mitarbeiter isolierten aus Mistextrakt und der Kulturflüssigkeit gewisser Bakterien und Pilze eine ziegelrote kristalline Substanz, von der 5 γ /ml ein optimales Wachstum von *P. Kleinii* und anderen *Pilobolus*-Arten (die nicht näher bezeichnet sind) ermöglichen sollen. Die Substanz wurde Coprogen genannt. Hämin war unter den gleichen Bedingungen nur $\frac{1}{1000}$ so wirksam.

Die Arbeit von KLEIN, in der ebenfalls ein neuer Wachstumsfaktor beschrieben wird, war mir nicht zugänglich.

Ein Vergleich mit den eigenen Ergebnissen zeigt, daß das Coprogen (HESELITINE) bzw. der Faktor I (PAGE) offenbar mit dem von mir postulierten Faktor A identisch ist. Ein genauer Vergleich ist bisher auf Grund der spärlichen Angaben noch nicht möglich. Die Natur der weiteren Faktoren ist noch unklar.

Literatur.

- BERSA, E.: Kultur und Ernährungsphysiologie der Gattung *Pilobolus*. Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss., Wien, Math.-nat. Kl. Abt. I, **139**, 355 (1930). — BULLER, R.: Researches on Fungi, Vol. VI, 1934. — DELITSCH, H.: Zur Entwicklungsgeschichte d. koprophilen Ascomyceten. Diss. Leipzig 1926. — HESELITINE, C. C., C. PIDACKS, A. R. WHITEHALL, N. BOHONOS, B. L. HUTCHINGS and J. H. WILLIAMS: Coprogen, a new growth factor for coprophilic fungi. J. Americ. Chemic. Society, **74**, 1362 (1952). — JANKE, A.: Die Wuchsstofffrage in der Mikrobiologie. Zbl. Bakter. II, **100**, 409 (1939). — KEHL, H.: Morphologie u. Physiol. d. Zygophoren von *Mucor mucedo*. Arch. f. Mikrobiol. **8**, 379 (1937). — KLEIN, D.: A possible new growth factor in cow manure. Journ. Biol. Chem. 1952. — KRAFCZYK, H.: Die Zygosporenbildung bei *Pilobolus crystallinus*. Ber. d. deutsch. Bot. Ges. **49**, 141 (1931). — Die Bildung und Keimung der Zygosporen von *Pilobolus crystallinus* und sein heterocaryotisches Mycel. Beitr. z. Biol. d. Pflanz. **23**, 349 (1935). — KREIPE, H.: Unters. üb. d. Milchsäurebakterienflora des Kuhpansens. Diss. Kiel 1927. — LYE, H.: Zur Kenntnis der Sexualverhältnisse und der Ernährungsphysiologie der Gattung *Pilobolus*. Diss. Halle/S. 1952; Zur Kenntnis der Sexualverhältnisse der Gattung *Pilobolus*. Arch. f. Protistenkde. (im Druck). — MOLLARD: Rôle des bacteries dans la production des perithèces des Ascobolées. Compt. Rend. Acad. Sci. T. **136** (1903). — MOSER, W.: Unters. üb. Wachstumsfaktoren bei Mikroorganismen. Diss. Bern 1940. — PAGE, R. M.: The effect of nutrition on growth and sporulation of

Pilobolus. Amer. J. of Bot. **39**, 731 (1952). — RONSDORF: Vergl. Unters. üb. d. Wirk. verschied. Wuchsstoffe auf das Wachstum einiger Pilze. Arch. f. Mikrobiol. **6**, 309 (1935). — RUDOLF: Wuchsstoffe und Antiwuchsstoffe, 5. Beih. d. Zeitschr. f. Vitaminforschung, 1948. — SCHEUNERT u. M. SCHIEBLICH: Einfluß d. Mikroorganismen auf d. Vorgänge im Verdauungstrakt bei Herbivoren. Handb. d. norm. u. path. Physiol. **3**, 967 (1927). — SCHNEIDER, R.: Phototropische Studien an Sporangienträgern von *Pilobolus*. Diss. Breslau 1943. — SCHOPFER, W. H.: Recherches sur l'influence nutritive sur la formation des Zygotes chez les Mucorinées hétérothalliques. C. r. Soc. Phys. et Hist. nat. Genève **44**, 116 (1927); Vitamine und Wachstumsfaktoren bei Mikroorganismen. Erg. d. Biol. **16**, 1 (1939). — STOLL, K.: Unters. üb. d. koprophenen Pilze unserer Haustiere. Cbl. Bakt. II **90**, 97 (1934). — VODERBERG, K.: Zum Nährstoff- und Wirkstoffbedürfnis v. *Coprinus lagopus*. Z. f. Naturf. **3b**, 272 (1948).

(Aus dem Botanischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule Hohenheim.)

Darstellung von Bakteriengeißeln mittels Phasenkontrast.

Von

ERWIN BURCIK und BRIGITTE PLANKENHORN.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 11. September 1953.)

Für die Darstellung der Bakterien-Geißeln wurde seit LÖFFLERS klassischer Färbemethode eine große Zahl weiterer Verfahren angegeben. Abgesehen von der Beobachtung lebender Bakterien im Dunkelfeld, die für lokomotorische Untersuchungen über den Geißelapparat unerlässlich sind, werden für diagnostische Arbeiten Färbungen bzw. Imprägnierungen verwendet. Fast stets wird bei diesen Verfahren durch Niederschlag einer Beize (Tannin) zunächst eine Verdickung der Geißeln bewirkt. Dann erst erfolgt ihre Darstellung durch einen Farbstoff oder durch Niederschlag eines Edelmetalles (Silber, Gold).

Von uns wurden im Laufe der Zeit insgesamt 16 dieser Verfahren¹ geprüft. Trotz den dabei erzielten zum Teil sehr guten Bildern konnte uns keine der Methoden auf die Dauer befriedigen. Fast alle Verfahren ergeben keine einheitlichen Resultate, sondern versagen mitunter aus unerklärlichen Gründen; die Reinigung der Deckgläschen muß mit größter Sorgfalt erfolgen; die verwendeten Farblösungen sind infolge ihres hohen Farbgehaltes oft unangenehm im Gebrauch, und die Methoden selbst sind nur zu oft äußerst zeitraubend und umständlich, was durch die Unbeständigkeit mancher Lösungen noch verstärkt wird.

Das Phasenkontrastverfahren bietet nun eine Möglichkeit, diese Nachteile zu vermeiden. Bis auf wenige Ausnahmen sind die Geißeln der Bakterien bei normalen Beobachtungsbedingungen auch im Phasenkontrastmikroskop unsichtbar. Wir versuchten daher eine Verdickung der Geißeln durch Beizen zu erzielen und gelangten auf diesem Wege zu dem nachstehend beschriebenen Verfahren.

Hilfsmittel und Vorgang.

Die Reinigung der Deckgläschen erfolgt durch Anhauchen und Abreiben mit einem sauberen Tuch. Es dürfen nur fabrikneue, nicht über 0,17 mm dicke Gläschen verwendet werden. Mit einer Pinzette erfaßt man sie an einer Ecke und führt sie in kurzen Abständen wechselweise mit Ober- und Unterseite für je höchstens 1 sec in die nicht leuchtende Flamme des Bunsenbrenners. Abglühen über der Sparflamme führt zum Durchbiegen oder Springen der Gläschen.

Die Herstellung der Ausstriche erfolgt am besten von jungen Kolonien auf Schrägagarröhrchen mit gut beweglichen Zellen. Vom unteren Drittel des Röhrchens, nicht direkt aus dem Kondenswasser, wird eine Spur des Rasens ohne Nährbodenpartikel abgenommen und in 1 Tropfen (etwa 5 Normalösen) abgekochten Leitungswassers übertragen. Dabei ist kräftiges Rühren oder Verreiben zu ver-

¹ BENIGNETTO & GINO, BUNGE, CASARES-GIL, VAN ERMENGEM, GEMELLI, GRAY, GRAY-ABET, HINTERBERGER, LÖFFLER, LUCA-VALENTI, PEPLER, PITFIELD, PEPPER, ROTTGARDT, RYU, TODA, ZETTNOW.

meiden. Mit einer 1 mm-Öse wird ein Tröpfchen von dieser Aufschwemmung kreisförmig auf eines der vorbereiteten Deckgläschen ausgestrichen. Der Durchmesser des Ausstriches soll ungefähr 1 cm betragen.

Die Fixierung wird durch Räucherung mit Osmiumsäure vorgenommen. Man legt das Deckgläschen mit dem noch feuchten Ausstrich nach unten über die Öffnung eines Fläschchens mit 2%iger Osmiumsäure und läßt die Dämpfe etwa 30 sec lang einwirken. Dann hebt man das Deckglas ab und läßt den Ausstrich an der Luft trocknen.

Die Beizung wird mit ZETTNOWS Antimon-Tannin-Beize vorgenommen: 10 g Tannin in 150 cm³ Wasser aufkochen, filtrieren und auf 50° C abkühlen lassen. Dazu kommen etwa 35–36 cm³ einer 5%igen Lösung von Brechweinstein unter dauerndem Schütteln, bis eine bleibende leichte Trübung entsteht. Die Beize soll beim Aufkochen im Reagensglas klar werden und sich beim Abkühlen wieder trüben. Bleibt sie klar, so ist noch mehr Brechweinsteinlösung zuzusetzen; ist die Trübung zu stark, etwa gar milchweiß, so muß etwas Tanninlösung zugegeben werden. Nach Beigabe von einem Kristall Thymol ist die Beize in gut verkorkter Flasche lange haltbar. Vor Gebrauch gut schütteln, die benötigte Menge im Reagensglas kurz bis zur Klärung erhitzen.

Man gießt dann soviel der heißen, klaren Beize auf das horizontal gelegte Deckgläschen, daß dieses bis zum Rande bedeckt ist. Nach 3 min ist die Beize abgekühlt und deutlich opalescent getrübt. Sie wird unter der Wasserleitung mit einem Schwung abgespült, damit das feine irisierende Häutchen, das man an der Oberfläche beobachten kann, sich nicht auf dem Ausstrich ablagert. Das Deckgläschen wird darauf zwischen Filtrierpapier oder, nach Eintauchen in destilliertes Wasser, an der Luft getrocknet.

Die Untersuchung im Phasenkontrastmikroskop erfolgt entweder in Wasser oder, was noch bessere Kontraste ergibt, in Luft. Im letzten Falle legt man das Deckgläschen mit der Ausstrichseite auf einen sauberen Objektträger und legt die Ecken mit je einem Tröpfchen verflüssigter Vaseline oder Wachs fest.

Ergebnisse und mögliche Fehlerquellen.

In richtig hergestellten Präparaten heben sich die Geißeln als dunkle Wellenlinien klar von dem meist sehr sauberen Untergrund ab. Bei Untersuchung in Luft werden die Geißeln (Abb. 1, 2) so kontrastreich dargestellt, daß bei einiger Übung schon mit dem starken Trockensystem die günstigsten Stellen des Ausstriches ausgewählt werden können. Bei Untersuchung in Wasser ist der Kontrast zwar etwas geringer, dafür sind aber die Geißelansatzstellen am Bakterienkörper vor allem bei „peritricher“ Begeißelung deutlicher (Abb. 1, 3). Monotriche (Abb. 1, 5) oder lophotriche Begeißelung (Abb. 1, 4 u. 6) sind auch in Luft klar erkennbar.

Wenn auch durch PIJPER (1930) sowie PIETSCHMANN (1939, 1942) nachgewiesen wurde, daß die Bilder der „peritrichen“ Begeißelung nur dadurch zustandekommen, daß die Individuen zu mehreren zusammenhängen ohne sich zu trennen, so ändert das nichts an der diagnostischen Bedeutung dieses Merkmals gegenüber ausgesprochen monotrich oder lophotrich begeißelten Formen. Gerade für diese Unterscheidung hat sich bei uns das beschriebene Verfahren als einfacher und sicherer Geißelnachweis bewährt.

Die möglichen Fehlerquellen sind bei dieser Art der Untersuchung auf ein Minimum reduziert. Selbst in Fällen, in denen die Beweglichkeitsprüfung nur einige wenige bewegliche Individuen ergab, waren an vereinzelter Zellen die Geißeln in der typischen Anordnung klar zu erkennen. Wichtig ist vor allem eine gute Fixierung. Bilder wie in Abb. 1, 1 sind ausnahmslos die Folge schlechter Fixierung. Daher ist auf richtige Konzentration der Osmiumsäure zu achten. Ihre Haltbarkeit wird durch kühle, dunkle Aufbewahrung und durch Zusatz einer Spur Chromsäure erhöht. Eine weitere, leicht vermeidbare Fehlerquelle ist das Übertragen von Nähr-

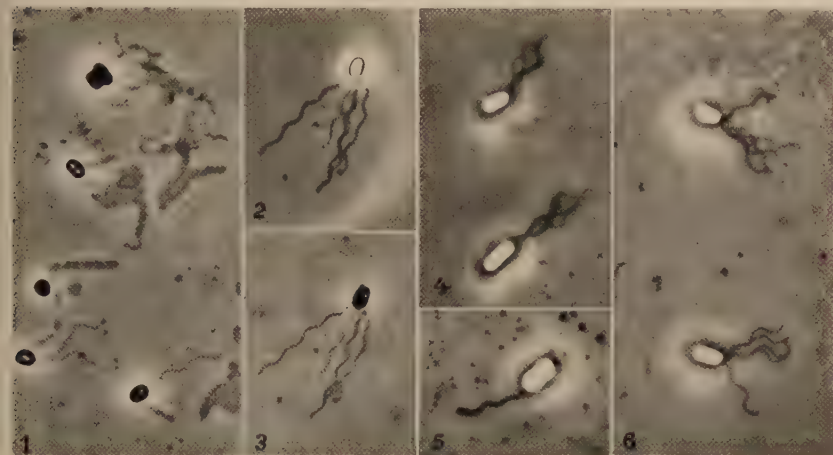


Abb. 1. 1 *Salmonella typhi-murium*, Wirkung zu schwacher Osmiumsäure. 2 *Serratia marcescens*, untersucht in Wasser. 3 *Serratia marcescens*, untersucht in Luft. 4 *Pseudomonas synchyanea*. 5 *Pseudomonas pyocyanea*. 6 *Xanthomonas spec.* (4–6 in Luft untersucht.) — Aufnahmen: 1–3 He-Pha-Du-Kondensor von Zeiss-Winkel. 4–6 Phasenkontrasteinrichtung von E. Leitz.

bodenpartikeln in den Ausstrichtropfen. Die Entnahmenadel oder Öse darf auf keinen Fall durch Auftupfen auf den Nährboden abgekühlt werden!

Endlich sei noch darauf hingewiesen, daß die in Luft beobachteten Ausstriche gute, haltbare Dauerpräparate ohne Gefahr des Ausblasens ergeben. Man braucht hierfür nur das Deckgläschen durch eine Lackumrandung auf dem Objektträger zu befestigen.

Zusammenfassung.

Eine Methode für die Darstellung von Bakterien-Geißeln im Phasenkontrast wird beschrieben: Fixierung der Ausstriche mit Osmiumsäuredämpfen, Beizung mit ZETTNOWS Antimon-Tannin-Beize und nachfolgende Untersuchung im Phasenkontrastmikroskop in Luft oder Wasser.

Dieses Verfahren arbeitet sicher und ist wegen seiner Einfachheit für differentialdiagnostische Untersuchungen besser geeignet als die bisher beschriebenen Methoden.

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Marburg.)

Über den Mechanismus der Nitratreduktion von Grünalgen.

II. Vergleichend-physiologische Untersuchungen.

Von

ERICH KESSLER.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. November 1953.)

Es ist eine bei physiologischen Untersuchungen an Mikroorganismen immer wieder gemachte Erfahrung, daß es nicht zulässig ist, an einem Objekt erzielte Ergebnisse verallgemeinernd als gültig für andere, auch nahe verwandte Arten anzusehen. Darauf wies bereits GAFFRON (1939) eindringlich hin (vgl. auch FOGG 1953). Die Nichtbeachtung dieser Tatsache bezüglich der Nitratreduktion führte dazu, daß die — sogar unter physiologisch sehr extremen Bedingungen gewonnenen — Ergebnisse von WARBURG u. NEGELEIN (1920) an *Chlorella pyrenoidosa* seither als gültig für zumindest die chlorococcalen Grünalgen insgesamt angesehen worden sind (vgl. BURSTRÖM 1945). Wir konnten demgegenüber den Nachweis führen, daß eine andere Grünalge, *Ankistrodesmus braunii*, sich in ihrem Verhalten sehr erheblich von der *Chlorella* WARBURGS unterscheidet (KESSLER 1952, 1953).

Bei *Ankistrodesmus* findet im Dunkeln in Nitratlösung bei $p_H < 4$ eine mit steigender Acidität zunehmende Anhäufung von Nitrit im Verlaufe der Nitratreduktion statt, beruhend auf einer Förderung der Reaktion $\text{Nitrat} \rightarrow \text{Nitrit}$ und einer Hemmung der weiteren Reduktion des Nitrits im stärker sauren p_H -Bereich. — WARBURG u. NEGELEIN dagegen konnten bei ihrem *Chlorella*-Stamm bei normalem O_2 -Druck NH_4^+ als einziges Produkt der physiologischen Nitratreduktion nachweisen; in Anaerobiose fanden sie eine im Gegensatz zur normalen Nitratreduktion gegen Cyanid unempfindliche Anhäufung von Nitrit, die sie als eine unphysiologische Nebenreaktion betrachteten.

Es galt nun, auf Grund einer vergleichenden Untersuchung verschiedener Grünalgen festzustellen, ob die Erscheinung der p_H -abhängigen Anhäufung von Nitrit bei der Nitratreduktion im Bereich der *Chlorococcales* von weiterer Verbreitung ist. Fernerhin mußte eine in ihrem Verhalten der von WARBURG verwendeten *Chlorella* ähnliche Alge gefunden werden, um die Frage zu klären, ob es sich bei der von WARBURG beobachteten Nitritbildung im „Nitratgemisch“ ($n/10 \text{ NaNO}_3 + n/100 \text{ HNO}_3$, p_H 2.0) bei O_2 -Entzug tatsächlich um einen pathologischen Vorgang handelt und damit die beiden Arten von Nitritanhäufung grundsätzlich voneinander verschiedene Reaktionen sind.

I. Methodik und Versuchsubjekte.

Bezüglich Algenkultur, manometrischer und analytischer Methodik sei auf die vorhergehende Mitteilung (KESSLER 1953) verwiesen.

Eine orientierende Untersuchung über die p_H -Grenze des Wachstums unserer Algenstämme im sauren Bereich erfolgte in der Weise, daß die normale Nitratlösung mit verdünnter Phosphorsäure auf den gewünschten p_H -Wert eingestellt wurde, jeweils in Abständen von 0,5 p_H -Einheiten. Nach Sterilisation und Beimpfung wurde das Anwachsen der Algen bei Dauerlicht von ungefähr 1500 Lux und ständigem Durchleiten von Luft mit Zusatz von etwa 2% CO_2 beobachtet. Der niedrigste p_H -Wert, bei dem noch eine Entwicklung der Kulturen stattfand, wurde als die Grenze des Wachstums im sauren Bereich bezeichnet.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden die folgenden, sämtlich in Marburg isolierten Algenstämme verwendet:

1. *Chlorella cf. ellipsoidea* Gerneck, Stamm „St“, eine elliptische Form mit den Zellmaßen $6-9 \mu \times 3-6 \mu$. (Die Maße der Art sind nach PASCHER $9-15 \mu \times 7,5$ bis $13,5 \mu$.) Dieser Stamm zeichnet sich durch eine überraschend hohe Resistenz gegen H-Ionen aus: Die Grenze des Wachstums liegt bei p_H 2,5.

2. *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson, Stamm „M“. Die Wachstumsgrenze liegt bei p_H 5,5 und stimmt mit derjenigen des von ÖSTERLIND (1949) verwendeten Stammes überein.

3. *Chlorella vulgaris* Beyerinck, Stamm „A“. Runde Zellen, Durchmesser etwa 3μ . Wachstumsgrenze bei p_H 4,5.

4. *Chlorella vulgaris* Beyerinck, Stamm „Kr“. Runde Zellen, Durchmesser etwa 5μ . Wachstumsgrenze bei p_H 5,0.

Vergleichsweise sei erwähnt, daß die Wachstumsgrenze des von HOPKINS und WANN (1926) verwendeten *Chlorella*-Stammes bei p_H 3,4 lag. Für unseren Stamm von *Ankistrodesmus braunii* liegt sie bei p_H 4,5.

II. Nitratreduktion und Nitritanhäufung in Anaerobiose bei *Chlorella cf. ellipsoidea*, Stamm „St“.

1. Nitrat- und Nitritreduktion im Dunkeln.

Bereits die manometrische Untersuchung des Dunkel-Stoffwechsels von *Chlorella* „St“ zeigt, daß diese Alge bezüglich ihrer Nitratreduktion erheblich von dem bei *Ankistrodesmus* gefundenen Verhalten abweicht. Es liegt der respiratorische Quotient in Nitratlösung auch zu Beginn eines Dunkelversuches nur wenig höher als bei Abwesenheit von Nitrat (Tab. 1 und 2); als Mittelwert zahlreicher Messungen fanden wir $RQ = 0,93$ für N-freie und $RQ = 1,03$ für Nitrat-Nährlösung¹. (Die entsprechenden Werte für *Ankistrodesmus* liegen bei 1,0—1,05 bzw. etwa 1,4.) Die Extra- CO_2 -Entwicklung ist also bei *Chlorella* „St“ minimal, d. h. die Fähigkeit dieser Alge, unter normalen Bedingungen im Dunkeln Nitrat zu reduzieren, ist nur äußerst gering. Dieses Ergebnis ist recht überraschend, wird doch allgemein den Grünalgen die Fähigkeit zu einer allerdings zeitlich begrenzten Nitratreduktion im

¹ Da bei dieser Alge der RQ in Abwesenheit von Nitrat unterhalb von 1,0 liegt, würde hier eine Betrachtung des RQ allein in Nitratlösung zu Fehlschlüssen führen. Erst eine vergleichende Untersuchung in Nährlösung mit und ohne Nitrat ermöglicht es hier, die Nitratreduktion manometrisch zu erfassen.

Tabelle 1. *Chlorella „St“*. Atmung (mm^3 je Stunde und mg Trockensubstanz) und respiratorischer Quotient in Nitratlösung, pH 2,5 und pH 4,4. 0,8 mg Trockensubstanz je ml. \pm KOH-Methode.

		1.—3. Std	4.—6. Std	7.—9. Std	10.—12. Std	13.—23. Std
pH 2,5	— O_2 . .	2,27	2,18	1,87	1,50	1,12
	+ CO_2 .	2,37	2,11	1,81	1,61	1,21
	Extra- CO_2	0,10	—	—	0,11	0,09
	RQ . .	— 1,04	— 0,97	— 0,97	— 1,07	— 1,08
pH 4,4	— O_2 . .	2,07	1,78	1,51	1,13	0,87
	+ CO_2 .	2,13	1,87	1,59	1,21	0,83
	Extra- CO_2	0,06	0,09	0,08	0,08	—
	RQ . .	— 1,03	— 1,05	— 1,05	— 1,07	— 0,96

Tabelle 2. *Chlorella „St“*. Atmung (mm^3 je Stunde und mg Trockensubstanz) und respiratorischer Quotient in Phosphatpuffer, pH 4,1, ohne bzw. mit Zusatz von Nitrit ($6,2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) nach 5 Std (\downarrow). 0,4 mg Trockensubstanz je ml. \pm KOH-Methode.

		1.—2. Std	3.—5. Std	6.—8. Std	9.—11. Std	12.—23. Std
Kontrolle	— O_2 . .	5,23	3,21	2,55	2,22	1,47
	+ CO_2 .	4,44	3,09	2,33	2,03	1,30
	Extra- CO_2	—	—	—	—	—
	RQ . .	— 0,85	— 0,97	— 0,91	— 0,91	— 0,88
+ NO_2'	— O_2 . .	4,67	2,88	\downarrow 2,73	1,94	1,27
	+ CO_2 .	4,03	2,85	3,58	1,79	1,21
	Extra- CO_2	—	—	0,85	—	—
	RQ . .	— 0,86	— 0,99	— 1,31	— 0,92	— 0,95

Dunkeln zugeschrieben. Nur in der Arbeit von WARBURG u. NEGELEIN (1920) findet sich die Angabe, daß der verwendete Stamm von *Chlorella pyrenoidosa* im Dunkeln eine Atmung mit $\text{RQ} = 1,0$ hatte, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Nitrat; lediglich bei Verwendung des „Nitratgemisches“ mit seiner hohen Konzentration an freier HNO_3 wurde eine starke Nitratreduktion (RQ anfangs etwa 1,6, dann im Laufe einiger Stunden auf 1,0 abfallend) gefunden.

Führt man Versuche mit *Chlorella „St“* in verschiedenen pH -Bereichen in Nitratlösung durch, so zeigen sich auch hier charakteristische Unterschiede gegenüber *Ankistrodesmus*. Auch bei starker Erhöhung der H -Ionenkonzentration findet nur die H -Ionen-bedingte mäßige Steigerung der Atmung statt, wie sie seit den Untersuchungen von EMERSON u. GREEN (1938) bekannt ist (Abb. 1). Die umfangreichen nitritbedingten Veränderungen des Stoffwechsels im stärker sauren Bereich, wie sie bei *Ankistrodesmus* gefunden wurden und wie sie für eine andere Alge,

Chlorella „A“, Abb. 2 zum Vergleich zeigt, fehlen hier. Es läßt sich auch bei p_H 2,0 in Nährlösung oder sogar im „Nitratgemisch“ bei normalem O_2 -Druck kein Nitrit nachweisen. Eine wesentliche Veränderung der Extra- CO_2 -Produktion findet auch in stark saurer Nährlösung nicht statt (Tab. 1): Die erhebliche Verstärkung der Nitratreduktion bei

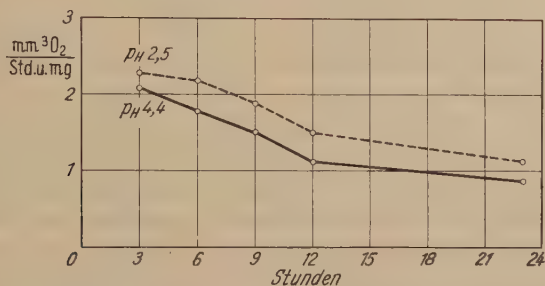


Abb. 1. *Chlorella cf. ellipsoidea*, Stamm „St“. Respiratorischer O_2 -Verbrauch in Nitratnährlösung bei p_H 2,5 und p_H 4,4. 0,8 mg Trockensubstanz je ml. KOH-Methode. Bei p_H 2,5 schwache Atmungssteigerung infolge erhöhter H -Ionenkonzentration.

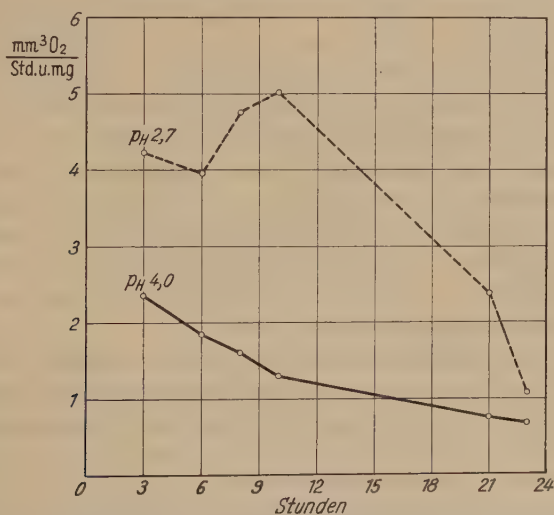


Abb. 2. *Chlorella vulgaris*, Stamm „A“. Respiratorischer O_2 -Verbrauch in Nitratnährlösung bei p_H 2,7 und p_H 4,0. 0,9 mg Trockensubstanz je ml. KOH-Methode. Bei p_H 2,7 sehr starke Atmungssteigerung infolge von Nitritanhäufung ($1,8 \cdot 10^{-5}$ m Nitrit am Schluß des Versuches).

steigender Acidität der Nährlösung, wie wir sie bei *Ankistrodesmus* beobachteten, ist bei *Chlorella* „St“ nicht vorhanden.

Ist nach diesen Erfahrungen die Dunkel-Nitratreduktion bei *Chlorella* „St“ in allen p_H -Bereichen nur äußerst gering, so ergibt sich daraus die Frage, ob es sich hierbei um eine Inaktivität des gesamten nitrat-reduzierenden Systems dieser Alge handelt, oder ob nur der erste Teil-

schritt, Nitrat \rightarrow Nitrit, gehemmt ist. Wird einer Suspension von *Chlorella „St“* in Phosphatpuffer im Dunkeln eine nicht toxisch wirkende Nitritmenge zugesetzt, so erfolgt wie bei *Ankistrodesmus* eine je nach p_H -Wert und Nitritkonzentration mehr oder weniger ausgeprägte Erhöhung der Atmung. Dabei steigt der RQ sogleich auf einen Wert von etwa 1,2 bis 1,4 an (Tab. 2), d. h. es findet eine erhebliche Extra-CO₂-Bildung als Zeichen starker Nitritreduktion statt¹. Nach einigen Stunden ist das Nitrit aus der Lösung verschwunden (vgl. auch Tab. 5, p_H 4,0), und RQ und Atmung haben wieder den alten Wert erreicht². Die gefundene Extra-CO₂-Menge entspricht auch hier gut dem theoretisch zu erwartenden Wert von 1½ Mol Extra-CO₂ je Mol Nitrit (vgl. KESSLER 1953). Die Geschwindigkeit der Nitritreduktion liegt in der gleichen Größenordnung wie bei *Ankistrodesmus*. Der wesentliche Unterschied zwischen beiden Algen besteht also darin, daß unter normalen Bedingungen im Dunkeln bei *Chlorella „St“* das für die Reaktion $\text{NO}_3' \rightarrow \text{NO}_2'$ verantwortliche System weitgehend inaktiv ist, während das nitritreduzierende System auch bei dieser Alge voll funktionsfähig ist. — Daß die Inaktivität der Nitratreduktion durch eine Hemmung der Nitrataufnahme bedingt wird, erscheint angesichts der schnellen Aufnahme und Reduktion von Nitrit durchaus unwahrscheinlich.

Jedoch ist die Hemmung der Nitratreduktion bei *Chlorella „St“* im Dunkeln nicht grundsätzlicher Art. Im „Nitratgemisch“ findet — übereinstimmend mit den Ergebnissen von WARBURG u. NEGELEIN an *Chlorella pyrenoidosa* — eine erhebliche, nach einigen Stunden zurückgehende Nitratreduktion statt (Tab. 3). Entsprechendes gilt auch unter den Bedingungen eines mäßigen Stickstoffmangels, wenn Algen nach längerer Vorbelichtung in N-freiem Medium im Dunkeln in normale Nitratnährlösung übertragen werden (Tab. 4).

Ein weiterer wesentlicher Unterschied gegenüber *Ankistrodesmus* liegt in der p_H -Abhängigkeit der Nitritreduktion: Sie erfährt bei *Chlorella „St“* eine zunehmende Hemmung mit abnehmender H-Ionenkonzentra-

¹ Der Zusatz einer entsprechenden Menge Nitrat führt weder zu einer Steigerung der Atmung noch zu einer meßbaren Veränderung des RQ. Die durch Nitrit induzierte Atmungssteigerung unterscheidet sich somit grundsätzlich von ähnlichen Erscheinungen, wie sie nach Zugabe von Nitrat (PIRSON 1937, SYRETT 1953) oder Ammonsalz (PIRSON 1938, SYRETT 1953) zu Algen im Zustand stärkeren N-Mangels beobachtet wurden. Denn die „Nitrit-Atmung“ wird, unabhängig von der An- oder Abwesenheit anderer N-Verbindungen, bereits durch äußerst geringe Konzentrationen an freier HNO₂ hervorgerufen.

² In den auf Tab. 1, 3 und 4 dargestellten Versuchen liegen die Atmungswerte erheblich tiefer. Dies ist eine Folge der „Selbsthemmung“ der Atmung in dichteren Suspensionen, die (unabhängig von der Schüttelgeschwindigkeit im WARBURG-Apparat!) bei *Ankistrodesmus braunii* (PIRSON, KROLLPFEIFFER u. SCHAEFER 1953) aufgefunden wurde und bei *Chlorella „St“* ebenfalls zu beobachten ist.

Tabelle 3. *Chlorella* „St“. Atmung (mm^3 je Stunde und mg Trockensubstanz) und respiratorischer Quotient im „Nitratgemisch“, p_{H} 2,0. 0,9 mg Trockensubstanz je ml. \pm KOH-Methode.

	1.—3. Std	4.—6. Std	7.—11. Std	12.—21. Std
— O_2	2,82	2,38	1,94	1,27
+ CO_2	4,03	3,23	2,38	1,30
Extra- CO_2	1,21	0,85	0,44	0,03
R.Q.	— 1,43	— 1,36	— 1,22	— 1,04

Tabelle 4. *Chlorella* „St“. Atmung (mm^3 je Stunde und mg Trockensubstanz) und respiratorischer Quotient in Nitratnährlösung, p_{H} 4,0. Algen 19 Std in N-freier Nährlösung vorbelichtet (2000 Lux). 1,0 mg Trockensubstanz je ml. \pm KOH-Methode.

	1.—5. Std	6.—8. Std	9.—12. Std	13.—22. Std
— O_2	3,42	2,99	2,88	1,78
+ CO_2	4,97	3,96	3,01	1,45
Extra- CO_2	1,55	0,97	0,13	—
R.Q.	— 1,45	— 1,32	— 1,05	— 0,82

Tabelle 5. *Chlorella* „St“. Reduktion zugesetzten Nitrits bei verschiedenem p_{H} -Wert (Phosphatpuffer). 0,1 mg Trockensubstanz je ml.

	Nitritkonzentration (Mol/Liter)			
	anfangs	nach 2 Std	nach 5 Std	nach 7 Std
p_{H} 4,0	$5,9 \cdot 10^{-5}$	$3,2 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-5}$	$0,7 \cdot 10^{-5}$
p_{H} 5,0	$5,9 \cdot 10^{-5}$	$4,6 \cdot 10^{-5}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$2,9 \cdot 10^{-5}$
p_{H} 6,0	$5,9 \cdot 10^{-5}$	$5,7 \cdot 10^{-5}$	$5,5 \cdot 10^{-5}$	$5,4 \cdot 10^{-5}$

tion (Tab. 5). Zieht man die Tatsache in Betracht, daß normalerweise wegen der Inaktivität der Reaktion $\text{Nitrat} \rightarrow \text{Nitrit}$ die erhebliche Kapazität des nitritreduzierenden Systems dieser Alge nicht annähernd ausgenutzt ist, und berücksichtigt man fernerhin, daß im sauren p_{H} -Bereich die Fähigkeit zur Nitritreduktion sogar weiter erhöht wird, während die Reaktion $\text{Nitrat} \rightarrow \text{Nitrit}$ keine Verstärkung erfährt, so wird es verständlich, daß eine p_{H} -abhängige Nitritanhäufung im sauren Bereich bei *Chlorella* „St“ völlig ausgeschlossen ist.

2. Wirkung von Anaerobiose und von Cyanid.

Da somit in mancher Beziehung eine Übereinstimmung im Verhalten von *Chlorella* „St“ mit WARBURGS *Chlorella pyrenoidosa* festzustellen ist, war das Verhalten unserer Alge bei Anaerobiose von besonderem Interesse. Das Ergebnis einiger Versuche zeigt Tab. 6: Unter reinstem, von O_2 -Spuren über glühendem Kupfer befreitem Stickstoff kommt es in

Tabelle 6. *Chlorella „St“*. Nitritanhäufung in Anaerobiose in Nitratnährlösung bei verschiedenem pH-Wert und im „Nitratgemisch“.

		Nitritkonzentration (Mol/Liter)	Versuchsdauer (Std)	Trockensubstanz (mg/ml)
Nitratnährlösung pH 6,8	Luft	0	22	2,3
	100% N ₂ . .	$10,0 \cdot 10^{-5}$	22	2,3
Nitratnährlösung pH 4,4	Luft	0	22	2,3
	100% N ₂ . .	$7,0 \cdot 10^{-5}$	22	2,3
Nitratnährlösung pH 2,8	Luft	0	22	1,7
	100% N ₂ . .	$1,3 \cdot 10^{-5}$	22	1,7
Nitratgemisch pH 2,0	Luft	0	10	2,1
	100% N ₂ . .	$2,6 \cdot 10^{-5}$	10	2,1

Nitratnährlösung zu einer erheblichen Anhäufung von Nitrit, und zwar in allen pH-Bereichen mit einer deutlich erkennbaren Förderung im schwächer sauren bis neutralen Bereich. Im „Nitratgemisch“ erfolgt, entsprechend der sehr hohen Nitratkonzentration, eine stärkere und schnellere Nitritanhäufung als in stark saurer Nährlösung (Tab. 6), wobei nach einiger Zeit die letale HNO₂-Konzentration erreicht wird, so daß die Algen unter Braunfärbung zugrunde

gehen, wie dies WARBURG und NEGELEIN bei *Chlorella pyrenoidosa* fanden.

Tabelle 7. *Chlorella „St“*. Wirkung von Anaerobiose auf die Nitritreduktion. Phosphatpuffer, pH 4,1. Nitrit $4\frac{1}{2}$ Std nach Versuchsbeginn zugekippt ($6,0 \cdot 10^{-5}$ Mol/l). 0,8 mg Trockensubstanz je ml.

	Nitritkonzentration (Mol/Liter)	
	anfangs	nach 6 Std
Luft . . .	$6,0 \cdot 10^{-5}$	$0,2 \cdot 10^{-5}$
100% N ₂ .	$6,0 \cdot 10^{-5}$	$5,0 \cdot 10^{-5}$

Auch bei *Chlorella „St“* erfährt — wie bei *Ankistrodesmus* — die Nitritreduktion in Anaerobiose eine weitgehende Hemmung (Tab. 7). In keinem Fall ist offenbar bei Ausschaltung der aeroben Atmung eine erhebliche Nitritreduktion

mehr möglich, während auch hier der erste Teilprozeß der Nitratreduktion, NO₃' → NO₂', von der Atmung nicht so sehr abhängig ist. Im Falle von *Chlorella „St“* ist sogar eine geringfügige Verstärkung der sonst so schwachen Reaktion Nitrat → Nitrit in Anaerobiose nicht ganz ausgeschlossen. — Der an sich mögliche Einwand, daß eine Hemmung der Ionenaufnahme bei O₂-Entzug für die Hemmung der Nitritreduktion verantwortlich sei, erscheint uns nicht berechtigt angesichts der Tatsache, daß in Nitratnährlösung in Anaerobiose eine Nitritanhäufung und mithin auch eine Nitrataufnahme und -reduktion stattfindet.

Nachdem somit bei *Chlorella „St“* eine Anhäufung von Nitrit in Anaerobiose wie bei WARBURGS *Chlorella pyrenoidosa* aufgefunden worden

war, blieb noch die für die Beurteilung dieser Nitritbildung wesentliche Frage nach ihrer Beeinflußbarkeit durch Cyanid. Denn gerade die Unempfindlichkeit der bei WARBURGS Objekt in Anaerobiose im „Nitratgemisch“ stattfindenden Nitritanhäufung gegen Blausäure war es, die ihn veranlaßte, diese Reaktion als einen unphysiologischen Vorgang ohne Beziehung zur normalen, äußerst HCN-empfindlichen Nitratreduktion zu betrachten.

Setzt man der Nährlösung 10^{-5} m KCN zu, so unterbleibt die Anhäufung von Nitrit in Anaerobiose durch *Chlorella* „St“ vollständig; setzt man dem „Nitratgemisch“ 10^{-5} m KCN zu, so wird auch unter diesen Bedingungen in Anaerobiose kein Nitrit angehäuft (Tab. 8), und die Algen werden vor der Nitritvergiftung bewahrt. — In diesem Punkt können wir die Angaben von WARBURG und NEGELEIN nicht bestätigen. Die auf diesen Befund gegründete Ansicht dieser Autoren, daß das in Anaerobiose angehäuften Nitrit das Produkt einer unphysiologischen Reaktion ohne Beziehung zur normalen Nitratreduktion

Tabelle 8. *Chlorella* „St“. Wirkung von 10^{-5} m KCN auf die Nitritanhäufung in Anaerobiose in Nitratnährlösung und im „Nitratgemisch“.

		Nitritkonzentration (Mol/Liter)	Versuchsdauer (Std)	Trockensubstanz (mg/ml)
Nitratnährlösung	—	$1,1 \cdot 10^{-5}$	24	1,1
pH 2,8	+ KCN	0	24	1,1
Nitratgemisch	—	$5,6 \cdot 10^{-5}$	11	1,5
pH 2,0	+ KCN	0	11	1,5

sei, erscheint uns deshalb angreifbar. Auch im Falle von WARBURGS *Chlorella pyrenoidosa* dürfte die Nitritanhäufung in Anaerobiose zwanglos zu deuten sein als die Folge einer mit abnehmendem O_2 -Druck zunehmenden Hemmung der weiteren Reduktion des Nitrits im Verlaufe der normalen Nitratreduktion. Hierfür spricht auch die Angabe von WARBURG und NEGELEIN: „Und zwar wird um so mehr salpetrige Säure, um so weniger Ammoniak ausgeschieden, je geringer der Sauerstoffdruck.“

Die Empfindlichkeit der Nitritreduktion gegen Cyanid liegt bei *Chlorella* „St“ in der gleichen Größenordnung wie bei *Ankistrodesmus*. Auf eine genaue Wiedergabe der diesbezüglichen Befunde wurde daher verzichtet.

3. Wirkung von Phenylurethan.

Wird einer Suspension von *Chlorella* „St“ im „Nitratgemisch“ bei normalem O_2 -Druck N-Phenylurethan¹ ($1,5 \cdot 10^{-3}$ m) zugesetzt, so kommt

¹ Präparat von Firma Dr. Th. Schuchardt G.m.b.H., München.

Tabelle 9. *Chlorella* „St“. Nitritanhäufung im „Nitratgemisch“, p_H 2,0, bei Zusatz von Phenylurethan ($1,5 \cdot 10^{-3}$ m). 1,4 mg Trockensubstanz je ml.

	Nitritkonzentration (Mol/Liter)		
	nach 2 Std	nach 5 Std	nach 8 Std
—	0	0	0
+ Urethan	$0,4 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^{-5}$

es zu einer Anhäufung von Nitrit (Tab. 9), und die Algen gehen nach einiger Zeit zugrunde. Auch in dieser Beziehung besteht eine weitgehende Übereinstimmung zwischen WARBURGS Objekt und *Chlorella* „St“.

Prüft man die Wirkung von Urethan auf die Nitritreduktion, so zeigt sich eine stark ausgeprägte Hemmung dieser Reaktion (Tab. 10). Hier liegt ein klarer Unterschied gegenüber der minimalen Wirkung dieses Narkoticums auf die Nitritreduktion bei *Ankistrodesmus* vor.

Tabelle 10. *Chlorella* „St“. Wirkung von Phenylurethan ($1,5 \cdot 10^{-3}$ m) auf die Reduktion zugesetzten Nitrats. Phosphatpuffer, p_H 4,0. 0,2 mg Trockensubstanz je ml.

	Nitritkonzentration (Mol/Liter)			
	anfangs	nach 2 Std	nach 5 Std	nach 7 Std
—	$5,9 \cdot 10^{-5}$	$3,3 \cdot 10^{-5}$	$0,6 \cdot 10^{-5}$	$0,2 \cdot 10^{-5}$
+ Urethan	$5,9 \cdot 10^{-5}$	$5,2 \cdot 10^{-5}$	$4,4 \cdot 10^{-5}$	$4,1 \cdot 10^{-5}$

In normaler Nährlösung führt ein Zusatz von Urethan zu keiner Nitritanhäufung. Das ist nicht überraschend, weil unter diesen Bedingungen die Reaktion Nitrat \rightarrow Nitrit nur sehr gering und die erhebliche Kapazität des nitritreduzierenden Systems nicht annähernd ausgenutzt ist. Eine partielle Hemmung der Nitritreduktion braucht deshalb noch nicht zu einer Anhäufung dieses Zwischenproduktes zu führen; dies ist erst der Fall, wenn im „Nitratgemisch“ eine erhebliche Verstärkung der Nitratreduktion stattgefunden hat.

Beiläufig sei bemerkt, daß auch hier — wie bei *Ankistrodesmus* — ein Zusatz von 10^{-4} m 2,4-Dinitrophenol in Phosphatpuffer (p_H 4) die Reduktion zugesetzten Nitrats fast vollständig verhindert. Jedoch soll diese Frage erst nach Abschluß weiterer Untersuchungen erörtert werden.

Vergleicht man abschließend die an *Chlorella* „St“ gewonnenen Ergebnisse mit der Nitratreduktion anderer Pflanzen, so zeigt sich in vieler Beziehung eine Übereinstimmung mit den in zahlreichen Fällen an Bakterien und Pilzen sowie an höheren Pflanzen gemachten Erfahrungen. Denn im allgemeinen liegt das Maximum der Nitratreduktion nicht bei stark saurer Reaktion, wie bei *Ankistrodesmus*, sondern vielmehr im etwa neutralen p_H -Bereich (vgl. BURSTRÖM 1945). Ferner wird bei Mikroorganismen vorwiegend in Anaerobiose eine Anhäufung von Nitrit gefunden (vgl. z. B. STICKLAND 1931 für *Escherichia coli*, KOSTYTSCHEW

1. TSWETKOWA 1920 für Schimmelpilze, und SCHLEGEL 1953 für das chemosynthetische Bacterium *Hydrogenomonas*). Ähnliches gilt auch für Wurzeln höherer Pflanzen (NANCE 1948, 1950; JONES, SHEPARDSON u. PETERS 1949). — In der weitgehenden Inaktivität der Nitratreduktion im Dunkeln besteht darüber hinaus eine gewisse Übereinstimmung von *Chlorella „St“* und Weizenblättern (BURSTRÖM 1942, 1943).

III. Nitratreduktion und p_H -abhängige Nitritanhäufung bei 3 weiteren Algen-Arten.

Im Anschluß an die Untersuchungen mit *Chlorella „St“*, deren Verhalten in vielen Punkten mit den Ergebnissen von WARBURG und NEGELEIN an *Chlorella pyrenoidosa* übereinstimmt, wurden drei weitere Algen auf ihre Nitratreduktion im Dunkeln und auf Nitritanhäufung untersucht. In allen drei Fällen wurde eine p_H -abhängige Anhäufung von Nitrit bei normalem O_2 -Druck, zunehmend mit steigender Acidität der Nährlösung, beobachtet und damit die weitere Verbreitung dieser zuerst bei *Ankistrodesmus* gefundenen Art der Nitratreduktion bei Grünalgen sichergestellt. Besteht zwar im Prinzip bei den untersuchten Objekten weitgehende Übereinstimmung mit *Ankistrodesmus*, so wurden doch manche Unterschiede beobachtet, die für eine vergleichende Betrachtung der Nitratreduktion bei Grünalgen von Bedeutung sind.

1. *Scenedesmus quadricauda*, Stamm „M“.

Unter allen untersuchten Objekten liegt hier der Extremfall p_H -abhängiger Nitritanhäufung vor. Bereits in neutraler Nährlösung findet eine schwache Anhäufung von Nitrit statt, die mit steigender H-Ionenkonzentration schnell zunimmt (Tab. 11). Unterhalb von etwa p_H 4 gehen die Algen schließlich an Nitritvergiftung zugrunde, weil dort nach einiger Zeit die letale Konzentration an freier HNO_2 erreicht wird.

Hier handelt es sich somit um einen Fall, wo bei einer Alge unter normalen Bedingungen, in durchaus „physiologischen“ p_H -Bereichen, die Nitratreduktion die Leistungsfähigkeit des nitritreduzierenden Systems

Tabelle 11. *Scenedesmus*. Nitritanhäufung bei verschiedenem p_H -Wert im Dunkeln in Nitratnährlösung. 0,8 mg Trockensubstanz je ml.

	Nitritkonzentration (Mol/Liter)			
	nach 4 Std	nach 8 Std	nach 12 Std	nach 24 Std
p_H 4,0 . . .	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$2,8 \cdot 10^{-5}$	$4,7 \cdot 10^{-5}$	$7,8 \cdot 10^{-5}$
p_H 5,0 . . .	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$	$3,4 \cdot 10^{-5}$	$6,4 \cdot 10^{-5}$
p_H 6,0 . . .	$0,4 \cdot 10^{-5}$	$0,7 \cdot 10^{-5}$	$0,9 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$
p_H 7,0 . . .	$0,4 \cdot 10^{-5}$	$0,7 \cdot 10^{-5}$	$0,8 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$

30*

erheblich überschreitet, so daß es stets — bei Verwendung unserer Nährlösung mit $8 \cdot 10^{-3}$ m KNO_3 — zu einer Ausscheidung von Nitrit ins Außenmedium kommt. — Auch hier wird — wie bei allen untersuchten Objekten — durch Zusatz von 10^{-5} m KCN die Reaktion $\text{Nitrat} \rightarrow \text{Nitrit}$ so weit gehemmt, daß keine Nitritanhäufung mehr stattfindet.

Allgemein ergibt sich daraus für physiologische Versuche mit dieser Alge im Dunkeln die Folgerung, daß — um Störungen durch Nitritanhäufung zu vermeiden — eine in bezug auf Nitrat weniger konzentrierte Lösung zu verwenden ist. Wird die Nitratkonzentration von $8 \cdot 10^{-3}$ m auf $8 \cdot 10^{-4}$ m herabgesetzt, so findet bei pH 4,5 eine geringe, aber noch deutliche Nitritanhäufung statt (Tab. 12). Für diesen pH-Bereich ist also selbst die Menge von $8 \cdot 10^{-4}$ m KNO_3 noch zu hoch, während es bei etwa pH 7 unter diesen Bedingungen zu keiner nennenswerten Anhäufung von Nitrit mehr kommt.

Tabelle 12. *Scenedesmus*. Wirkung der Nitratkonzentration auf die Nitritanhäufung

	Nitratnährlösung mit	Nitrit- konzentration (Mol/Liter)	Versuchsdauer (Std)	Trocken- substanz (mg/ml)
pH 4,5	$8 \cdot 10^{-3}$ m KNO_3	$23,0 \cdot 10^{-5}$	24	0,6
	$8 \cdot 10^{-4}$ m KNO_3			
	+ $7,2 \cdot 10^{-3}$ m KCl	$1,4 \cdot 10^{-5}$	24	0,6
	1:10 verdünnt: $8 \cdot 10^{-4}$ m KNO_3	$2,0 \cdot 10^{-5}$	24	0,6
pH 6,8	$8 \cdot 10^{-3}$ m KNO_3	$4,9 \cdot 10^{-5}$	23	0,7
	1:10 verdünnt:			
	$8 \cdot 10^{-4}$ m KNO_3	$0,2 \cdot 10^{-5}$	23	0,7

Damit ist erneut, wie auch bei *Ankistrodesmus*, die Bedeutung der Nitratkonzentration für die Nitratreduktion der Grünalgen nachgewiesen. Da OLSEN (1950) zeigen konnte, daß das Verhältnis der verschiedenen Ionen zueinander für die Aufnahmegeschwindigkeit der einzelnen Ionen von großer Bedeutung ist, haben wir für diese Versuche nicht nur — wie früher bei *Ankistrodesmus* — eine Verminderung allein des Nitratgehaltes der normalen Lösung auf ein Zehntel vorgenommen (Ausgleich durch Zusatz von KCl), sondern haben auch die Nährlösung insgesamt im Verhältnis 1:10 verdünnt. Auch unter diesen Bedingungen bleibt die Konzentrationsabhängigkeit der Nitritanhäufung erhalten (Tab. 12). In der etwas geringeren Anhäufung von Nitrit in der erstgenannten Lösung kann man vielleicht eine Hemmwirkung der dort in höherer Konzentration vorhandenen anderen Ionen auf die Nitrataufnahme im Sinne von OLSEN sehen.

Wird vergleichend die Nitritanhäufung bei normalem O_2 -Druck und unter reinstem Stickstoff untersucht, so zeigt sich, daß hier in Anaerobiose die Nitritanhäufung nahezu vollständig unterbunden wird (Tab. 13). Da, wie bei allen anderen untersuchten Objekten, auch bei *Scenedesmus* in N_2 -Atmosphäre die Reduktion von Nitrit weitgehend

gehemmt ist, muß hier — im Gegensatz zu *Chlorella* „St“ — auch der erste Teilprozeß der Nitratreduktion, $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}'_2$, durch O_2 -Entzug ganz oder fast ganz unterbunden werden. Der Typ der pH -abhängigen Nitritanhäufung ist hier also am vollkommensten entwickelt, und das Verhalten von *Scenedesmus quadricauda* scheint in extremem Gegensatz zu den bei *Chlorella* „St“ gefundenen Verhältnissen zu stehen.

Tabelle 13. *Scenedesmus*. Wirkung von O_2 -Entzug auf die Nitritanhäufung in Nitratnährlösung, pH 4,5.

Nitritkonzentration (Mol/Liter)		Versuchsdauer (Std)	Trocken- substanz (mg/ml)
Luft	100 % N_2		
$12,5 \cdot 10^{-5}$	0	22	0,7
$23,0 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	24	0,6

Atmung und Extra- CO_2 -Entwicklung liegen bei *Scenedesmus* in der gleichen Größenordnung wie bei *Ankistrodesmus*. Unterhalb von pH 4—4,5 kommt es zu erheblichen Atmungssteigerungen infolge der Nitritanhäufung, während bei geringerer Acidität trotz unter Umständen erheblicher Nitritkonzentration die für eine nennenswerte Erhöhung der Atmung notwendige HNO_2 -Konzentration nicht erreicht wird. — Die Wirkung von Phenylurethan auf die Nitritreduktion ist hier minimal, wie bei *Ankistrodesmus*. Auch bezüglich der pH -Abhängigkeit der Nitritreduktion verhält sich *Scenedesmus* ähnlich wie diese Alge. Aus diesem Grunde erübrigt sich eine Wiedergabe der Versuchsdaten.

2. *Chlorella vulgaris*, Stamm „A“.

Bei diesem Stamm setzt die pH -abhängige Nitritanhäufung erst bei etwa pH 3 ein (Tab. 14). In Anaerobiose erfährt sie eine deutliche Verminderung (Tab. 15), ähnlich wie bei *Ankistrodesmus*, dem überhaupt diese Alge in ihrer Nitratreduktion recht ähnlich ist. Den respiratorischen O_2 -Verbrauch von *Chlorella* „A“ innerhalb und außerhalb des Nitrit- pH -

Tabelle 14. *Chlorella* „A“. Nitritanhäufung bei verschiedenem pH -Wert im Dunkeln in Nitratnährlösung. 0,8 mg Trockensubstanz je ml.

	Nitritkonzentration (Mol/Liter)			
	nach 4 Std	nach 7 Std	nach 19 Std	nach 25 Std
pH 2,0	$0,7 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$ Algen abgestorben
pH 3,0	0	$0,2 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$
pH 4,0	0	0	0	0

Tabelle 15. *Chlorella* „A“. Wirkung von O_2 -Entzug auf die Nitritanhäufung in Nitratnährlösung, pH 2,7. 0,9 mg Trockensubstanz je ml. Versuchsdauer 24 Std.

	Luft	100 % N_2
Nitritkonzentration	$1,8 \cdot 10^{-5}$ m	$0,7 \cdot 10^{-5}$ m

Bereiches zeigt Abb. 2 (S. 441). Im Vergleich zu dem in Abb. 1 dargestellten, unter etwa gleichen Bedingungen mit *Chlorella* „St“ durchgeführten Versuch ergibt sich klar der große Unterschied im Verlauf der Atmung zwischen Algen, die wie *Chlorella* „A“ im sauren Bereich Nitrit anhäufen, und solchen, die nur in Anaerobiose Nitrit ausscheiden (*Chlorella* „St“). Die Atmung im stärker sauren p_H -Bereich kann daher als ein indirektes Kennzeichen zur Unterscheidung der beiden Arten von Nitratreduktion bei Algen dienen.

In einem Punkt besteht jedoch ein größerer Unterschied gegenüber *Ankistrodesmus*: Die Reduktion von Nitrit wird durch höhere H-Ionenkonzentrationen gefördert, in etwa der gleichen Weise, wie dies für *Chlorella* „St“ auf Tab. 5 dargestellt ist; Voraussetzung ist dabei natürlich, daß die schädigende Konzentration an freier HNO_2 nicht erreicht wird. Aus diesem Ergebnis folgt, daß hier die verglichen mit *Ankistrodesmus* schwächere und auf stärker saure Bereiche beschränkte Nitritanhäufung so zu erklären ist: Beide Komponenten der Nitratreduktion, Nitritbildung und Nitritreduktion, haben zwar eine qualitativ gleiche p_H -Abhängigkeit; jedoch wird durch höhere H-Ionenkonzentration die Reaktion $NO_3' \rightarrow NO_2'$ stärker gefördert als die weitere Reduktion des Nitrits, so daß unterhalb von p_H 3 eine allerdings nicht sehr erhebliche Nitritanhäufung einsetzt.

Auch hinsichtlich der Urethanwirkung auf die Nitritreduktion gleicht das Verhalten von *Chlorella* „A“ dem von *Chlorella* „St“ (vgl. Tab. 10).

Liegt damit bei *Chlorella* „A“ zwar ein eindeutiger Fall p_H -abhängiger Nitritanhäufung vor, so zeigt diese Alge doch in den beiden letztgenannten Punkten eine deutliche Übereinstimmung mit *Chlorella* „St“. Noch klarer treten diese Übergänge zwischen den scheinbar so weit voneinander abweichenden Verhältnissen bei *Scenedesmus quadricauda* einerseits und *Chlorella* „St“ andererseits bei dem im folgenden zu besprechenden *Chlorella*-Stamm hervor.

3. *Chlorella vulgaris*, Stamm „Kr“.

Dieser sicher mit *Chlorella* „A“ nahe verwandte Stamm, der sich morphologisch durch einen größeren Zelldurchmesser zu erkennen gibt, ist physiologisch deutlich von jenem unterschieden. Auch bei *Chlorella* „Kr“ findet eine p_H -abhängige Anhäufung von Nitrit statt, die etwa bei p_H 2

Tabelle 16. *Chlorella* „Kr“. Nitritanhäufung im „Nitratgemisch“, p_H 2,0.
2,5 mg Trockensubstanz je ml.

Nitritkonzentration (Mol/Liter)			
nach 1 Std	nach 2 Std	nach 4 Std	nach 6 Std
$1,8 \cdot 10^{-5}$	$4,8 \cdot 10^{-5}$	$6,2 \cdot 10^{-5}$	$4,3 \cdot 10^{-5}$ Algen abgestorben

einsetzt und in normaler Nährlösung recht gering ist; erst bei erhöhter Nitratkonzentration, im „Nitratgemisch“, wird sie erheblich und führt innerhalb weniger Stunden zum Absterben der Algen (Tab. 16), ähnlich wie dies bei *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus* und *Chlorella* „A“, nicht aber bei *Chlorella* „St“, der Fall ist.

Bemerkenswert ist das Verhalten gegenüber Anaerobiose: Unter reinstem N_2 erfährt die p_H -abhängige Nitritanhäufung eine klare Verstärkung; sie ist unter diesen Bedingungen auch noch bei p_H 5 schwach erkennbar. Jedoch liegt auch in Anaerobiose — im Gegensatz zu *Chlorella* „St“ — das Maximum der Nitritanhäufung im stark sauren Bereich (Tab. 17). Bei *Chlorella* „Kr“ liegt damit ein eindeutiger Übergang zwischen den beiden Prinzipien der p_H -abhängigen Nitritanhäufung und der Nitritanhäufung in Anaerobiose vor.

Auch in den übrigen Eigenschaften der Nitratreduktion nimmt *Chlorella* „Kr“ eine vermittelnde Stellung ein. Die Extra- CO_2 -Produktion als Maß für die Dunkel-Nitratreduktion liegt zwischen den für *Chlorella* „St“ und für *Ankistrodesmus* mitgeteilten Werten; der RQ sinkt im Laufe von ungefähr 20 Std von anfangs etwa 1,25 auf 1,0.

Bezüglich der Wirkung von Phenylurethan auf die Nitritreduktion und der p_H -Abhängigkeit der Nitritreduktion stimmt *Chlorella* „Kr“ mit den *Chlorella*-Stämmen „St“ und „A“ überein.

IV. Diskussion.

Betrachtet man die in Tab. 18 gegebene Zusammenfassung der an 5 Algen gewonnenen Einzelbefunde, so kommt man zunächst angesichts einer verwirrenden Fülle verschiedenster Resultate zu dem Ergebnis, daß nicht 2 Stämme darunter sind, deren Verhalten sich völlig gleicht. Bezüglich der p_H -Abhängigkeit von Nitritanhäufung und Nitritreduktion, sowie der Wirkung von Anaerobiose und von Urethan sind alle nur denkbaren Möglichkeiten verwirklicht in jeweils verschiedener Kombination bei den verschiedenen Algen. Aber bei aller Mannigfaltigkeit der Befunde lassen sich dennoch einige wichtige, allen untersuchten Arten gemeinsame Prinzipien erkennen, die damit kennzeichnend für die Nitratreduktion dieser Organismengruppe insgesamt sein dürften.

Stellt man zunächst den Anaerobiose-Nitrit-Typ (*Chlorella* „St“) der p_H -abhängigen Nitritanhäufung, in ihrer klarsten Form bei *Scenedesmus*

Tabelle 17. *Chlorella* „Kr“. Wirkung von O_2 -Entzug auf die Nitritanhäufung in Nitratnährlösung bei verschiedenem p_H -Wert. 1,0 mg Trockensubstanz je ml. Versuchsdauer 22 Std.

	Nitritkonzentration (Mol/Liter)	
	Luft	100% N_2
p_H 2,0	$0,5 \cdot 10^{-5}$	—
p_H 2,7	0	$0,7 \cdot 10^{-5}$
p_H 4,9	0	$0,4 \cdot 10^{-5}$

Tabelle 18. Zusammenfassende Übersicht über die Eigenschaften der Nitratreduktion im Dunkeln bei 5 verschiedenen Grünalgen.

	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	<i>Ankistrodesmus braunii</i>	<i>Chlorella vulgaris</i> „A“	<i>Chlorella vulgaris</i> „Kr“	<i>Chlorella cf. ellipsoidea</i> „St“
pH-abhängige Nitritanhäufung bei . . .	pH < 7	pH < 4	pH < 3	pH < 2	0
Nitritanhäufung in Anaerobiose	minimal	vermindert	vermindert	verstärkt	stark
Reaktion Nitrat → Nitrit im sauren pH-Bereich	verstärkt	verstärkt	verstärkt	verstärkt	nicht verstärkt
Nitritreduktion im sauren pH-Bereich . .	vermindert	vermindert	verstärkt	verstärkt	verstärkt
Nitratreduktion im Dunkeln	normal	normal	normal	schwach	minimal
Nitritreduktion im Dunkeln	normal	normal	normal	normal	normal
Nitritreduktion in Anaerobiose	sehr gering	sehr gering	sehr gering	sehr gering	sehr gering
Nitritanhäufung nach Zusatz von 10 ⁻⁵ m KCN	0	0	0	0	0
Wirkung von Urethan auf die Nitritreduktion	minimal	minimal	stark hemmend	stark hemmend	stark hemmend
Wachstumsgrenze im sauren Bereich . . .	pH 5,5	pH 4,5	pH 4,5	pH 5,0	pH 2,5

quadricauda verwirklicht, gegenüber, so sieht man, daß zwischen diesen scheinbar so verschiedenen Typen alle denkbaren Übergänge vorhanden sind und daher kein prinzipieller Unterschied besteht. Bei allen untersuchten Arten ist somit die Möglichkeit gegeben, durch experimentelle Eingriffe, wie hohe H-Ionenkonzentration oder O₂-Entzug, die Teilprozesse der Nitratreduktion $\text{NO}_3' \rightarrow \text{NO}_2'$ und $\text{NO}_2' \rightarrow \text{NH}_4'$ in verschiedener Weise zu beeinflussen und so das Nitrit als Zwischenprodukt nachzuweisen. — Daß darüber hinaus die vielfach bewährte Methode der Anwendung von Stoffwechselgiften zur selektiven Hemmung einzelner Teilprozesse in biochemischen Reaktionsketten auch bei der Nitratreduktion anwendbar ist, zeigen die durch Urethan erzielte Nitritanhäufung im „Nitratgemisch“ bei *Chlorella* „St“ und die bei *Ankistro-*

desmus gefundene Unterbrechung der Nitratreduktion auf der Nitritstufe durch 2,4-Dinitrophenol, über die nach Abschluß weiterer Untersuchungen ausführlicher berichtet werden wird.

Fernerhin ist allen Objekten gemeinsam die hohe Empfindlichkeit der ersten Teilreaktion, Nitrat \rightarrow Nitrit, gegen Cyanid, weswegen es überall — im sauren Bereich und in Anaerobiose — gelingt, durch 10^{-5} m KCN die Nitritanhäufung zu unterbinden. Bei dem Nitrit in Anaerobiose ist dieser Befund zunächst überraschend, steht er doch in deutlichem Widerspruch zu dem Ergebnis WARBURGS an *Chlorella pyrenoidosa*, daß die pathologische Nitritanhäufung in Anaerobiose durch Cyanid nicht beeinflußt wurde. Jedoch haben WARBURG und NEGELEIN in diesem Falle nicht das Nitrit analytisch nachgewiesen, sondern lediglich den „zeitlichen Verlauf der Verfärbung“ der Algen bei Anaerobiose im „Nitratgemisch“ mit und ohne KCN verfolgt und in beiden Fällen ein Absterben unter Braunfärbung festgestellt. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß *Ankistrodesmus* im „Nitratgemisch“ bei Zusatz von KCN (10^{-4} m) nach etwa 18 Std abstirbt, ohne daß es zu einer Nitritanhäufung kommt (KESSLER 1953), allein also auf Grund der Giftwirkung des KCN im unphysiologischen Milieu des „Nitratgemisches“. Daher liegt als Erklärung für den Widerspruch zwischen WARBURGS und unseren Ergebnissen die Annahme nahe, daß auch WARBURGS *Chlorella pyrenoidosa* bei Anaerobiose im blausäurehaltigen „Nitratgemisch“ durch das Cyanid, nicht aber durch Nitrit, zugrunde gegangen ist. Es sei jedoch betont, daß angesichts der starken Variabilität der Nitratreduktion bei Grünalgen die Existenz einer HCN-unempfindlichen pathologischen Nitritanhäufung im Sinne WARBURGS zwar unwahrscheinlich, doch nicht vollständig ausgeschlossen erscheint.

Besondere Erwähnung verdient, daß unter allen untersuchten Algen nicht eine fähig ist, in Anaerobiose, bei Ausschaltung der aeroben Atmung, Nitrit zu reduzieren. Dies zeigt wieder die allgemeine Bedeutung des schon aus unseren Untersuchungen an *Ankistrodesmus* abgeleiteten Prinzips der weitgehenden energetischen Kopplung der Nitratreduktion und insbesondere des Teilprozesses der Nitritreduktion im Dunkeln an die aerobe Atmung. Lediglich die energetisch weniger anspruchsvolle Reaktion Nitrat \rightarrow Nitrit kann offenbar bis zu einem gewissen Grade auch unabhängig von der Atmung in Anaerobiose (*Chlorella* „St“) oder nach dem Atmungsabfall durch beginnende Nitritvergiftung im sauren Bereich (*Ankistrodesmus*) ablaufen. — Anzeichen für eine Unabhängigkeit der Nitratreduktion bei Algen von der Atmung, wie sie von WARBURG und NEGELEIN angenommen wurde, haben wir in keinem Falle gefunden (vgl. dazu auch MYERS 1949).

Daß keine direkte Beziehung zwischen der Wachstumsgrenze im sauren Bereich und der p_H -abhängigen Nitritanhäufung besteht, geht aus Tab. 18

hervor. Jedoch muß man dennoch damit rechnen, daß in einigen Fällen auch die Nitratreduktion einer unter mehreren für die Wachstumsgrenze im sauren Bereich verantwortlichen begrenzenden Faktoren sein kann. Allerdings sind hier neben unspezifischen Schädigungen wohl in erster Linie die Verschlechterung der Stoffbilanz, hervorgerufen durch Steigerung der Atmung und Herabsetzung der photosynthetischen Leistung bei zunehmender Acidität, und Hemmungen der Zellteilung zu nennen. Wir beobachteten bei Wachstumsversuchen mit *Ankistrodesmus* im sauren Bereich häufig große, abnorm geformte und wahrscheinlich mehrkernige Zellen, wie sie bei dieser Alge vielfach unter ungünstigen Bedingungen auftreten (vgl. PIRSON u. KELLNER).

Jedenfalls zeigen unsere Untersuchungen, daß erhöhte H-Ionenkonzentrationen sehr wohl in der Lage sein können, spezifische Wirkungen im Ablauf biochemischer Reaktionen in vivo auszuüben, und daß bei manchen Algen das Nitrat im sauren pH-Bereich im Dunkeln eine Giftwirkung infolge von Nitritanhäufung hervorzurufen vermag. Somit besteht nicht stets jene oft zitierte Gleichwertigkeit von Nitrat und Ammonsalz (z. B. ALBERTS-DIETERT 1941) als Stickstoffquellen bei Grünalgen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, für bestimmte physiologische Untersuchungen an Algen jeweils geeignete Versuchsobjekte auszuwählen: Sollen Stoffwechselvorgänge in stärker sauren Lösungen ($\text{pH} < 4-4,5$) bei Anwesenheit von Nitrat gemessen werden, so muß man solche Objekte wählen, die — wie z. B. *Chlorella* „St“ — keine pH-abhängige Nitritanhäufung zeigen und daher eine Untersuchung unabhängig von nitritbedingten Störungen erlauben. Umgekehrt sind für Versuche in Anaerobiose, sei es zur Erforschung von Gärungsvorgängen oder der Wirkung von O_2 -Entzug auf die Photosynthese, nur solche Algen verwendbar, bei denen keine nennenswerte Nitritanhäufung in Anaerobiose, verbunden mit irreversibler Schädigung der Zellen, vorkommt.

Aus der Beobachtung, daß Nitratreduktion und Nitritanhäufung nicht nur durch pH-Wert und O_2 -Druck, sondern auch durch die Nitratkonzentration der Nährlösung in starkem Maße beeinflusst werden, ergibt sich die Folgerung, daß z. B. für *Scenedesmus quadricauda* Nährlösungen mit mehr als etwa $8 \cdot 10^{-4}$ m Nitrat zumindest bei Untersuchungen unterhalb von pH 4—5 nicht verwendbar sind, weil man anderenfalls bei dieser Alge mit sehr erheblicher Nitritanhäufung rechnen muß.

Abschließend kann gesagt werden, daß der Typ der pH-abhängigen Nitritanhäufung offenbar häufiger ist im Bereich der Grünalgen als der bisher allein bekannte Anaerobiose-Nitrit-Typ. Die so mannigfaltigen Abwandlungen im Verlauf der Nitratreduktion bei den *Chlorococcales*, ja selbst innerhalb der einen Gattung *Chlorella*, sind ein eindringlicher Beweis dafür, daß sich erst auf Grund einer Vielzahl von Einzelbefunden

an verschiedenen Objekten eine allgemein gültige Aussage über den Mechanismus einer biochemischen Reaktion bei einer größeren Organismengruppe gewinnen läßt.

Zusammenfassung.

1. Die Nitratreduktion im Dunkeln wurde bei 4 verschiedenen Grünalgen (*Chlorella* cf. *ellipsoidea*, 2 Stämme von *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quadricauda*) vergleichend untersucht unter besonderer Berücksichtigung der Teilprozesse Nitritbildung und Nitritreduktion. Eine Übersicht über zahlreiche Einzelbefunde bietet Tab. 18 auf Seite 452.

2. Drei Stämme zeigen — ebenso wie *Ankistrodesmus braunii* — eine p_H -abhängige Nitritanhäufung im sauren Bereich, die bei 2 Stämmen von *Chlorella vulgaris* unterhalb von p_H 3 bzw. p_H 2, bei *Scenedesmus quadricauda* dagegen bereits bei etwa p_H 7 einsetzt. Bei diesen Algen tritt im stärker sauren p_H -Bereich eine extreme Atmungssteigerung, hervorgerufen durch das angehäuften Nitrit, auf.

3. Bei *Chlorella* cf. *ellipsoidea* kommt es demgegenüber nur in Anaerobiose zu einer Anhäufung von Nitrit. Auch hier ist die Reaktion $\text{Nitrat} \rightarrow \text{Nitrit}$ — im Gegensatz zu den Angaben von WARBURG und NEGELEIN — sehr stark cyanidempfindlich; es handelt sich hier ebenfalls bei dem Nitrit um das Zwischenprodukt der normalen Nitratreduktion, nicht um das Ergebnis einer pathologischen Nebenreaktion. — Die Nitritanhäufung in Anaerobiose findet nicht nur im sauren „Nitratgemisch“ statt, sondern auch in normaler Nährlösung; sie erfährt sogar im schwach sauren bis neutralen p_H -Bereich eine deutliche Verstärkung.

4. Zwischen dem Extremfall p_H -abhängiger Nitritanhäufung (*Scenedesmus quadricauda*) und der Nitritanhäufung in Anaerobiose (*Chlorella* cf. *ellipsoidea*) sind bei den übrigen untersuchten Stämmen alle möglichen Übergänge verwirklicht (vgl. Tab. 18).

5. Bei allen untersuchten Algen gelingt es, durch experimentelle Eingriffe (hohe H-Ionenkonzentration oder Anaerobiose; fernerhin in einigen Fällen durch Phenylurethan oder 2,4-Dinitrophenol) den Teilprozeß der Nitritreduktion selektiv so stark zu hemmen, daß es zu einer Anhäufung dieses Zwischenproduktes der Nitratreduktion kommt.

6. Anzeichen für eine Unabhängigkeit der Nitratreduktion von der aeroben Atmung, wie von WARBURG und NEGELEIN angenommen wurde, wurden bei keiner der untersuchten Algen gefunden. In allen Fällen wird bei Ausschaltung der Atmung durch O_2 -Entzug der normale Ablauf dieser Reaktion, insbesondere des Teilprozesses der Nitritreduktion, unterbunden.

7. Im Gegensatz zu allen übrigen untersuchten Algen findet bei *Chlorella* cf. *ellipsoidea* im Dunkeln — auch im stärker sauren p_H -Bereich —

nur eine minimale Nitratreduktion statt. Dies ist bedingt durch eine Inaktivität der Reaktion $\text{NO}'_3 \rightarrow \text{NO}'_2$: Wird an Stelle von Nitrat Nitrit geboten, so erfolgt eine schnelle Reduktion. Eine Aktivierung der Reaktion $\text{NO}'_3 \rightarrow \text{NO}'_2$ läßt sich durch Anwendung von „Nitratgemisch“ oder durch starke Vorbelichtung in N-freier Lösung (= schwacher N-Mangel) erreichen.

8. Wegen sehr starker Nitritanhäufung ist *Scenedesmus quadricauda* für Dunkel-Versuche in saurer Nitratnährlösung nicht geeignet. Erst durch Herabsetzung der Nitratkonzentration auf $8 \cdot 10^{-4}$ m wird die Anhäufung von Nitrit stark vermindert.

9. Auf die Bedeutung vergleichend-physiologischer Untersuchungen für die Auswahl geeigneter Versuchsobjekte wird hingewiesen: Z. B. ist *Chlorella* cf. *ellipsoidea* für Untersuchungen des Stoffwechsels in Anaerobiose wegen störender Nitritanhäufung nicht geeignet, wohl aber sehr gut für Versuche in saurer Nitratnährlösung bei normalem O_2 -Druck. Gerade umgekehrt liegen die Verhältnisse bei *Scenedesmus quadricauda*, wo die sonst starke Nitritanhäufung durch O_2 -Entzug nahezu vollständig unterbunden wird.

Herrn Prof. Dr. A. PIRSON sei für anregende Diskussionen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung dieser Untersuchungen gedankt.

Literatur.

- ALBERTS-DIETERT, F.: Die Wirkung von Eisen und Mangan auf die Stickstoff-assimilation von *Chlorella*. *Planta* (Berl.) **32**, 88—117 (1941). — BURSTRÖM, H.: Die Licht-Abhängigkeit der Nitratassimilation des Blattes. *Naturwiss.* **30**, 645 bis 646 (1942); Photosynthesis and assimilation of nitrate by wheat leaves. *Ann. Agr. Coll. Sweden* **11**, 1—50 (1943); The nitrate nutrition of plants. *Ann. Agr. Coll. Sweden* **13**, 1—86 (1945). — EMERSON, R., and L. GREEN: Effect of hydrogen-ion concentration on *Chlorella* photosynthesis. *Plant Physiol.* **13**, 157—168 (1938). — FOGG, G. E.: The metabolism of algae. London 1953. — GAFFRON, H.: Über auffallende Unterschiede in der Physiologie nahe verwandter Algenstämme, nebst Bemerkungen über „Lichtatmung“. *Biol. Zbl.* **59**, 302—313 (1939). — HOPKINS, E. F., and F. B. WANN: Relation of hydrogen-ion concentration to growth of *Chlorella* and to the availability of iron. *Bot. Gaz.* **81**, 353—376 (1926). — JONES, L. H., W. B. SHEPARDSON and C. A. PETERS: The function of manganese in the assimilation of nitrates. *Plant Physiol.* **24**, 300—306 (1949). — KESSLER, E.: Nitritbildung und Atmung bei der Nitratreduktion von Grünalgen. *Z. Naturforsch.* **7b**, 280—284 (1952); Über den Mechanismus der Nitratreduktion von Grünalgen. I. Nitritbildung und Nitritreduktion durch *Ankistrodesmus braunii* (Nägeli) Brunnthaler. *Flora* **140**, 1—38 (1953). — KOSTYTSCHEW, S., u. E. TSWETKOWA: Über die Verarbeitung der Nitrate in organische Stickstoffverbindungen durch Schimmelpilze. *Z. physiol. Chem.* **111**, 171—200 (1920). — MYERS, J.: The pattern of photosynthesis in *Chlorella*. Kap. 17 in: *Photosynthesis in Plants*. Ames, Iowa 1949. — NANCE, J. F.: The role of oxygen in nitrate assimilation by wheat roots. *Amer. J. Bot.* **35**, 602—606 (1948); Inhibition of nitrate assimilation in excised wheat roots by various respiratory poisons. *Plant Physiol.* **25**, 722—735 (1950). — ÖSTERLIND, S.: Growth conditions of the alga *Scenedesmus quadricauda* with special

reference to the inorganic carbon sources. *Symbol. Bot. Upsal.* **10**, (3), 1—141 (1949). — OLSEN, C.: The significance of concentration for the rate of ion absorption by higher plants in water culture. *Physiol. Plant.* **3**, 152—164 (1950). — PASCHER, A.: Die Süßwasserflora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. Heft 5, *Chlorophyceae* 2. Jena 1915. — PIRSON, A.: Ernährungs- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an *Fontinalis* und *Chlorella*. *Z. f. Bot.* **31**, 193—267 (1937); Photosynthese und Mineralsalzernährung. *Forschungsdienst* **7**, 92—99 (1938). — PIRSON, A., u. K. KELLNER: Physiologische Wirkungen des Rubidiums. *Ber. dtsch. Bot. Ges.* **65**, 276—286 (1952). — PIRSON, A., I. KROLLPFEIFFER u. G. SCHAEFER: Leistungsfähigkeit und Fehlerquellen manometrischer Stoffwechselmessungen. *Marburger Sitzungsber.* **76**, 3—27 (1953). — SCHLEGEL, H.-G.: Physiologische Untersuchungen an wasserstoffoxydierenden Bakterien. *Arch. f. Mikrobiol.* **18**, 362—390 (1953). — STICKLAND, L. H.: The reduction of nitrates by *Bact. coli*. *Biochem. J.* **25**, 1543—1554 (1931). — SYRETT, P. J.: The assimilation of ammonia by nitrogen-starved cells of *Chlorella vulgaris*. I. The correlation of assimilation with respiration. *Ann. Bot.* **17**, 1—19 (1953). — WARBURG, O., u. E. NEGELEIN: Über die Reduktion der Salpetersäure in grünen Zellen. *Biochem. Z.* **110**, 66—115 (1920).

Autoren - Verzeichnis.

- AACH, H. G., Über Abbau und Regeneration der Chloroplastenfarbstoffe bei *Chlorella*. S. 166.
- ASSIS-LOPES, L., s. VAN UDEN, N. S. 262.
- BURCIK, E., und B. PLANKENHORN, Darstellung von Bakteriengeißeln mittels Phasenkontakt. S. 435.
- BÜSING, K.-H., W. DÖLL und K. FREYTAG, Die Bakterienflora der medizinischen Blutegel. S. 52.
- CLAYTON, R. K., Studies in the phototaxis of *Rhodospirillum rubrum*. I. Action spectrum, growth in green light, and WEBER Law adherence. S. 70.
- Studies in the phototaxis of *Rhodospirillum rubrum*. II. The relation between phototaxis and photosynthesis. S. 125.
- Studies in the phototaxis of *Rhodospirillum rubrum*. III. Quantitative relations between stimulus and response. S. 141.
- DÖLL, W., s. BÜSING, K.-H., und K. FREYTAG. S. 52.
- DOMSCH, K. H., Über den Einfluß photoperiodischer Behandlung auf die Befallsintensität beim Gerstenmehltau. S. 287.
- FREYTAG, K., s. BÜSING, K.-H., und W. DÖLL. S. 52.
- HARDER, R., und A. OPPERMANN, Über antibiotische Stoffe bei den Grünalgen *Stichococcus bacillaris* und *Protosiphon botryoides*. S. 398.
- KESSLER, E., Über den Mechanismus der Nitratreduktion von Grünalgen. II. Vergleichend-physiologische Untersuchungen. S. 438.
- KÜHLWEIN, H., Weitere Untersuchungen an Myxobakterien. S. 365.
- LANGE-DE LA CAMP, M., und W. STEINMANN, Speicherung von Schwermetallen in niederen Organismen. S. 87.
- LYR, H., Zur Kenntnis der Ernährungsphysiologie der Gattung *Pilobolus*. S. 402.
- MEVIUS jr., W., Beiträge zur Kenntnis von *Hyphomicrobium vulgare* STUTZER et HARTLEB. S. 1.
- NESEMANN, G., Über die antagonistische Beeinflussung des Wachstums und der Atmung bei einigen höheren Pilzen. S. 319.
- OETKER, H., Untersuchungen über die Ernährung einiger Myxobakterien. S. 206.
- OPPERMANN, A., s. HARDER, R. S. 398.
- PLANKENHORN, B., s. BURCIK, E. S. 435.
- PRINGSHEIM, E. G., Die Stellung der Grünen Bakterien im System der Organismen. S. 353.
- ROYAN, S., Studies on the Cytology of Yeasts. X. Mitosis in the Riboflavin. Excreting Mutant Top Yeast. S. 267.
- VON SCHELHORN, M., Hemmende und abtötende Wirkung von Konservierungsmitteln. S. 30.
- SÖRGEL, G., Über den Entwicklungsgang von *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox.) Stone. I. Die Bildung der Fortpflanzungsorgane in „normalen“ Kulturen. S. 247.
- Über den Entwicklungsgang von *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox.) Stone. II. Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Ausbildung der Fortpflanzungsorgane. S. 372.
- STEINMANN, W., s. LANGE-DE LA CAMP, M. S. 87.
- TAHA, EZZ-ELDIN, M., Über Wechselbeziehungen zwischen Schimmelpilzen. I. Der Einfluß verschiedener physiologischer Faktoren auf die Wechselbeziehungen zwischen *Alternaria tenuis* und *Fusarium semitectum*. S. 45.
- VAN UDEN, N., und L. ASSIS-LOPES, Zur Kenntnis von *Kloeckera Lodderi* sp. nov. S. 262.
- VON ZASTROW, E. M., Über die Organisation der Cyanophyceenzelle. S. 174.

reference to the inorganic carbon sources. *Symbol. Bot. Upsal.* **10**, (3), 1—141 (1949). — OLSEN, C.: The significance of concentration for the rate of ion absorption by higher plants in water culture. *Physiol. Plant.* **3**, 152—164 (1950). — PASCHER, A.: Die Süßwasserflora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. Heft 5, *Chlorophyceae* 2. Jena 1915. — PIRSON, A.: Ernährungs- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an *Fontinalis* und *Chlorella*. *Z. f. Bot.* **31**, 193—267 (1937); Photosynthese und Mineralsalznahrung. *Forschungsdienst* **7**, 92—99 (1938). — PIRSON, A., u. K. KELLNER: Physiologische Wirkungen des Rubidiums. *Ber. dtsch. Bot. Ges.* **65**, 276—286 (1952). — PIRSON, A., I. KROLLPFEIFFER u. G. SCHAEFER: Leistungsfähigkeit und Fehlerquellen manometrischer Stoffwechselmessungen. *Marburger Sitzungsber.* **76**, 3—27 (1953). — SCHLEGEL, H.-G.: Physiologische Untersuchungen an wasserstoffoxydierenden Bakterien. *Arch. f. Mikrobiol.* **18**, 362—390 (1953). — STICKLAND, L. H.: The reduction of nitrates by *Bact. coli*. *Biochem. J.* **25**, 1543—1554 (1931). — SYRETT, P. J.: The assimilation of ammonia by nitrogen-starved cells of *Chlorella vulgaris*. I. The correlation of assimilation with respiration. *Ann. Bot.* **17**, 1—19 (1953). — WARBURG, O., u. E. NEGELEIN: Über die Reduktion der Salpetersäure in grünen Zellen. *Biochem. Z.* **110**, 66—115 (1920).